

# **Fehérjék fényindukált reakcióinak követése Fourier-transzformált infravörös spektroszkópiával**

Kelemen Lóránd



Témavezető: Dr. Ormos Pál

MTA Szegedi Biológiai Központ, Biofizikai Intézet

Szeged, 2001

## Bevezető

A napenergia kémiai energiává alakítását egyes sókedvelő baktériumokban a bakteriorodopszin (bR) nevű fehérje végzi. Ez a hét  $\alpha$ -hélixből és egy Schiff-bázison (SB) keresztül hozzákapcsolódó fényérzékeny retinálból álló transzmembrán fehérje foton elnyelésének hatására a membránon átpumpál egy protonot. Így e két oldal közt proton koncentráció különbség alakul ki, amely később ATP szintézisét teszi lehetővé. A protonpumpálás egy ciklikus folyamatsor közben játszódik le, ennek során a fehérjében retinál izomerizáció, belső protontranszport, proton leadás a környezet felé illetve felvétel a környezetből és a másodlagos szerkezet megváltozása történik. Ezen folyamat – a fotociklus, mely során a fehérje több köztes állapota is megjelenik szekvenciálisan és/vagy párhuzamosan – igen sok részletében ismert. Különböző fotociklus modellek láttak napvilágot, és krisztallográfiás módszerekkel a fehérjeszerkezetet is meghatározták az alapállapot mellet a ciklus egyes köztes állapotaiban is. Az elmúlt években Röntgen diffrakcióval meghatározott kristályszerkezeti modellek azonban nem tudják 100%-os tisztaságban megadni egyetlen köztes állapot szerkezetét, mivel a minta a fotociklus minden időpillanatában legalább két intermedier keveréke.

A fehérjében lejátszódó szerkezeti változásokról azonban megfelelően kiegészített infravörös (IR) spektroszkópiával is gyűjthető információ. Infravörös differencia spektroszkópiával – többek között – egyetlen aminosav oldallánc protonáltsági állapotának megváltozását is nyomon lehet követni a bR-ban. Ezek közül lényeges az M intermedier kialakulásakor lejátszódó lépés, amikor egy, a retinál SB-ához kötött proton átadódik az Asp85-ös oldalláncnak. Lineárisan polarizált mérőfényű IR spektroszkópia segítségével a protonált oldallánc C=O kötése vibrációjának IR differencia csúcsából magának az oldalláncnak az iránya is meghatározható. Az IR spektrum Amid I tartományában megfigyelt differencia csúcsok a fehérje másodlagos

szerkezetében bekövetkező változásokra utalnak. Ezen csúcshoz, ugyancsak polarizált IR technikát használva, fehérje-oldalláncokat lehet rendelni, azaz a megfigyelt spektrális változások segítségével a szerkezeti változások lokalizálhatók.

A bakteriorodopszin alacsony (<2) pH-jú vizes oldatban, Cl<sup>-</sup> jelenléte mellett protonpumpából kloridpumpává konvertálható, miközben a fehérje az alapállapotból (bR) a savas bíbor állapotba (bR<sub>AP</sub>) kerül. Cl<sup>-</sup> jelenléte nélkül alacsony pH-n az ún. savas kék (bR<sub>AB</sub>) állapot jelenik meg, amely sem proton, sem Cl<sup>-</sup> pumpálására nem képes. NMR mérésekkel kimutatták, hogy a bR<sub>AB</sub> állapotban az Asp85 csoport protonált állapotban van. Ugyanezen csoport protonáltsági állapotára a bR<sub>AP</sub> állapotban az irodalom nem tartalmaz megbízható eredményeket, mert a bR<sub>AB</sub> és bR<sub>AP</sub> állapotokat a leírt kísérleti körülmények között nem lehetett egymástól függetlenül előállítani. A fehérjén belüli kloridkötés legvalószínűbb pozíciójaként a bR<sub>AP</sub> állapotban az irodalom a SB ellenion-rendszerét jelöli meg, amely a SB-ból, az elsődleges proton akceptor Asp85, továbbá az Asp212 és Arg82 oldalláncokból áll. E feltételzés igazolására az IR spektroszkópia szintén alkalmas olyan körülmények között, ahol csak a H<sup>+</sup> vagy csak a Cl<sup>-</sup> fehérjére gyakorolt hatása tanulmányozható.

A fotoaktív sárga fehérje (Photoactive Yellow Protein, PYP) egy kék fényre érzékeny fotoreceptor, mely pl. az *Ectothiorhodospira halophila* nevű baktériumban található. A fehérje feladata a kék fény érzékelése, és egy olyan kaszkádreakció elindítása, amelynek eredménye az organizmus kék fényű negatív fototaxisa. A PYP egy globuláris fehérje, legnagyobb részét α-helixből és β-redőzött rétegekből áll, fotoreceptora pedig egy, a 69-es Cys oldalláncon keresztül a fehérjéhez kötődő p-Coumaric Acid (pCA) molekula. Ez a kromofór a deprotonált tirozinhoz hasonlítható, mivel egy gyűrűs csoportban és egy ahhoz kötött oxigén atomban végződik (negatív töltés). A kromofórt a környező aminosav oldalláncok (Glu46, Arg52) alapállapotban H-híd kötésekkel keresztül stabilizálják.

PYP funkcióját a bR-hoz hasonlóan ugyancsak egy ciklikus reakció-sorozaton keresztül valósítja meg. A fény elnyelése után ps-okon belül megtörténik a kromofór izomerizációja, miáltal a pCA oxigénje közelebb kerül a Glu46-hoz. A következő lépésben protonátadás történik a Glu46-ról a kromoforra, ezután pedig ms-okon belül a fehérje nagy konformációváltozást szenved, létrejön az ún. jelző állapot. Ennek relaxációja, a proton visszakötése, valamint a retinál reizomerizációja 1s-on belül megtörténik, miáltal visszaáll az alapállapot.

A PYP fotociklusának tanulmányozása Fourier-transzformációs infravörös (FT-IR) spektroszkópiával szintén nagy előrelépést hozott a fehérje működésének megértésében. Az említett retinál izomerizációnak, a belső protontranszfernek, valamint a fehérjekonformáció megváltozásának igen jó spektrális markerei vannak az IR tartományban. Ezek változásainak időbeli követésével a működés még fel nem tárt kérdéseire szándékozunk választ kapni. Ilyen kérdések pl., hogy van-e a fotociklusban még nem azonosított köztes termék, vagy hogy a nagy konformációváltozásnak a jelző állapotban mi a közvetlen előidézője.

## Célkitűzések

I Meg kívántuk határozni a bakteriorodopszin fotociklus M és N állapotainak életideje alatt a fehérje IR differencia spektrumában jól megkülönböztethető csúccsal jelentkező Asp85, Asp96 és Asp115 oldalláncok térbeli orientációját a retinálhoz képest. Ezzel választ kerestünk arra, hogy ezen oldalláncok mozognak-e az egyes intermedierek életideje alatt, vagy csak akkor, amikor a fehérje egyik állapotból a másikba kerül. E mérések arra is választ adhatnak, hogy az említett oldalláncok karboxil csoportjában a H atom melyik oxigénhez van kötve.



2 A bakteriorodopszin IR differencia spektrumának Amid I tartományát vizsgálva meg kívántuk határozni, hogy a fehérje másodlagos szerkezetének az M és N állapotokban történő megváltozására utaló csúcsokhoz a fehérje mely tartományait lehet rendelni, azaz hol történik meg a fehérjekonformáció megváltozása az említett állapotokban.

3 Statikus FT-IR mérésekkel, az ún. ATR technikát használva meg kívántuk erősíteni, hogy a bakteriorodopszin SB-ának elsődleges proton akceptora, az Asp85 oldallánc protonálódik, amikor a fehérje a  $bR_{AB}$  állapotba kerül. Ezen felül meg kívántuk határozni az ily módon protonált Asp85 karboxil rezgésének IR frekvenciáját is. Ugyanezen technikával továbbá igazolni kívántuk, hogy a fehérje  $bR_{AP}$  állapotba kerüléskor a  $Cl^-$  ion a SB ellenion rendszerébe köt be, vagyis az Asp85, a SB és az Asp212 közelébe. Fel kívántuk tární, hogy az ion bekötése milyen változásokat indukál ezen környezetben.

4 Időfeloldásos FT-IR spektroszkópiával meg kívántuk mutatni, hogy a PYP fotociklusában van egy eddig spektroszkópikusan még nem jellemzett lépés, amely megelőzi a jelző állapotot, de amelyben a belső proton transzport a Glu46-ról a kromofór felé már lejátszódott. Igazolni próbáltuk továbbá, hogy a nagy fehérjekonformáció-változás közvetlen előidézője éppen a belső protonátadás miatt a Glu46 oldalláncon megjelenő negatív töltés egy igen hidrofób környezetben. E feltevésünk igazolását Glu46→Gln mutánsan elvégzett méréseknek a fiziológias mérésekkel történő összehasonlításával is igazolni kívántuk.

## Eredmények

1 Fotoszelekcióval kombinált, polarizált IR mérőfényvel, alacsony hőmérsékleten ( $T=-8^\circ C$ ) végrehajtott időfeloldásos (84ms) FT-IR méréseket végeztünk vad típusú bR fehérjén. Az eredményül kapott IR differencia

spektrumokból Gauss illesztés segítségével először meghatároztuk három protonált aszpartát oldallánc (elsődleges proton akceptor Asp85 és proton donor Asp96 és Asp115) karboxil csoportja C=O rezgésének irányát a retinálhoz képest ( $\Theta$  szög) az M és/vagy az N állapotban. Azt találtuk, hogy ezen oldalláncok iránya az M és N állapotok életideje alatt nem változik. Méréseink szerint változik azonban az Asp85 csoport iránya az M $\rightarrow$ N átmenet közben. A  $\Theta$  szög értékeit Röntgen krisztallográfias szerkezeti modellekkel összehasonlítva meg tudtuk határozni, hogy a fenti karboxil csoportok közül az Asp85-ön a proton a SB-hoz közelebb lévő oxigén atomon van az M állapotban, az Asp96-on a SB-tól távolabbi oxigén atomon az alapállapotban, és az Asp115-ön a citoplazmikus oldal felőli oxigén atomon az M és az N állapotban.

2 A bakteriorodopszin IR differencia-spektrumainak Amid I tartomány-beli sávjaihoz a fenti mérés során ugyancsak egy-egy  $\Theta$  szöget tudtunk rendelni. Ezen sávok akkor jelennek meg, ha a fehérje peptidkötéseinek C=O kötési a fehérjekonformáció-változás során valamilyen módon megváltoznak. Mivel elvileg mindegyik IR sávhoz található legalább egy megváltozott peptidkötés, így a méréseink eredményeként kapott  $\Theta$  szögeknek a Röntgen krisztallográfias szerkezettel való összevetése alapján néhány Amid I differencia sávot hozzá tudtunk rendelni peptidkötésekhez, és így néhány oldallánca szűkítettük a konformációváltozás lehetséges helyét.

3 A bakteriorodopszin savas kék és savas bíbor állapotainak vizsgálatát végeztük el ATR technikával kiegészített statikus FT-IR mérésekkel. A kétféle állapot elkülönített vizsgálata azáltal volt lehetséges, hogy a protonálás és a Cl<sup>-</sup> bekötés hatásait külön tudtuk kezelni. Ezt kétféle kísérlettel értük el: az elsőben az oldat Cl<sup>-</sup> koncentrációját 1M-on tartva csökkentettük a pH-t 7-ről 0-ra, és ily módon csak a protonálódás hatásait tapasztaltuk. Ezen kísérlet során a pH csökkentésével a bR $\rightarrow$ bR<sub>AB</sub> majd a bR<sub>AB</sub> $\rightarrow$ bR<sub>AP</sub> átmeneteket állítottuk elő. A

második mérés esetében  $\text{pH}=0$  mellett a  $\text{Cl}^-$  koncentrációt növeltük 0-ról 1M-ra, és így minden változás csak a  $\text{Cl}^-$  bekötés miatt történhetett. Ezen kísérlet alatt a  $\text{bR}_{\text{AB}} \rightarrow \text{bR}_{\text{AP}}$  átmenet következett be.

Megállapítottuk, hogy a  $\text{bR} \rightarrow \text{bR}_{\text{AB}}$  átmenetet feletti  $\text{pH}$  értéken a fehérje felületi karboxil csoportjai protonálódnak, és e protonált csoportok IR sávja nagyrészt elfedi a  $\text{bR} \rightarrow \text{bR}_{\text{AB}}$  átmenet során protonálódó Asp85 IR sávját, így annak a pozíciójának meghatározása ezen átmenet alatt nem lehetséges. Azt találtuk azonban, hogy a  $\text{bR}_{\text{AB}} \rightarrow \text{bR}_{\text{AP}}$  átmenet során két jelenség játszódik le párhuzamosan: egy belső karboxil csoport protonálódik (új sáv jelenik meg az  $1727\text{cm}^{-1}$  frekvencián), és egy másik, már protonált karboxil csoport környezete megváltozik (egy IR sáv eltolódik  $1754\text{cm}^{-1}$ -ről  $1727\text{cm}^{-1}$ -re). Az irodalmi adatok és Asp85  $\rightarrow$  Thr mutánson végzett azonos mérések alapján arra következtetünk, hogy a  $\text{bR}_{\text{AB}} \rightarrow \text{bR}_{\text{AP}}$  átmenet során egyrészt a  $\text{Cl}^-$  bekötése az Asp212 csoport protonálódását, másrészt az Asp85 COOH csoportja rezgési frekvenciájának megváltozását idézi elő. A  $\text{bR}_{\text{AB}} \rightarrow \text{bR}_{\text{AP}}$  átmenet segítségével így azt is meghatároztuk, hogy a  $\text{bR}_{\text{AB}}$  állapotban protonált Asp85 csoport IR frekvenciája az  $1754\text{cm}^{-1}$  értéknél van.

Megállapítottuk, hogy a  $\text{bR}_{\text{AP}}$  állapotban a  $\text{Cl}^-$  bekötéséhez az Asp85 protonáltsága szükséges feltétel, továbbá, hogy ezen  $\text{Cl}^-$  bekötés az Asp212 protonálódását idézi elő. Méréseinkkel alátámasztottuk azt a feltételezést, hogy a  $\text{Cl}^-$  a SB ellenion-rendszerébe köt be, és egy, az eredeti töltéseloszlást tekintve szimmetrikus szerkezethez hasonló ellenion-szerkezetet hoz létre.

4 10 $\mu\text{s}$ -os időfeloldású kinetikus FT-IR mérésekkel vad típusú PYP-n megmutattuk, hogy a fehérje fotociklusában van egy állapot a  $\text{pR}_{465}$  és a  $\text{pB}_{355}$  állapotok között. Ezt a  $\text{pB}'_{355}$  állapotot kinetikailag és spektroszkópiásan jellemeztük IR differencia spektruma alapján, és azt találtuk, hogy ebben az állapotban a fehérje pCA kromofórja izomerizált állapotban van, megtörtént a

belső protontranszfer a Glu46-ról a kromoforra, de nagy fehérjekonformáció-változások még nem következtek be.

A vad típusú minta eredményeinek Glu46→Gln mutánson mért adatokkal való összehasonlításával megmutattuk, hogy a Glu46 csoport hidrofób környezetben bekövetkező deprotonálódása váltja ki azt a nagy konformáció-változást, amit a pB<sub>355</sub> állapotban megfigyelhetünk. Ezen feltételezésünket alátámasztottuk elektrosztatikai számolással, és megbecsültük, hogy az az elektrosztatikus energia, ami azzal jár, ha hidrofób környezetben megjelenik egy negatív töltésű COO<sup>-</sup> csoport, hasonló nagyságrendű a protein lokális denaturációjához szükséges energiával.

PYP kristályon végzett FT-IR mérésekkel megállapítottuk, hogy a nagy fehérjekonformáció-változásnak feltétele a fehérje környezetének megfelelő víztartalma.

## **A dolgozattal kapcsolatban megjelent publikációk:**

- I. Kelemen, L., P. Galajda, S. Száraz and P. Ormos. 1999. Chloride ion binding to bacteriorhodopsin at low pH: an infrared spectroscopic study. *Biophys. J.* 76:1951–1958
- II. Kelemen, L. and P. Ormos. 2001. Structural changes in bacteriorhodopsin during the photocycle measured by time-resolved polarized Fourier-transform infrared spectroscopy. *Biophys. J.* 81:3577-3589
- III. Xie, A., L. Kelemen, J. Hendriks, B. J. White, K. J. Hellingwerf and W. D. Hoff. 2001. Formation of a new buried charge drives large-amplitude protein quake in photoreceptor activation. *Biochemistry.* 40:1510-1517.