

BAKTERIORODOPSZIN: EGY EGYSZERŰ PROTON PUMPA

ORMOS PÁL

Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Központ, Biofizikai Intézet, Szeged

Bevezetés

Napjainkra a biológiai rendszerek energiaháztartására alapvető adó MITCHELL-féle kemiozmotikus hipotézis általánosan elfogadottá vált (13). Ez az elv lényegében az élő rendszerek energia termelő és felhasználó mechanizmusainak kapcsolatát magyarázza. Lényege a következő: az energia termelése (külső energiaforrásokból biológiailag hasznosítható energiatípus létrehozása) mindig membránhoz kötötten zajlik. Megfelelő membránfehérjék — enzimek — a külső energia rovására protonot transzportálnak a membránon keresztül, így az energia elsődlegesen a membrán két oldala közti proton koncentráció különbség energiájává, a proton elektrokémiai potenciáljává alakul. Az így tárolt energiát később más, szintén membránokban levő rendszerek használják fel a különböző energiaigényes folyamatokhoz.

Jellemző példa az energiatranszformációk e sorozatára az oxidatív foszforiláció. Első lépésben a tápanyag elégetése nyomán felszabadult energia rovására működő protonpumpák létrehozzák a proton koncentráció különbséget, ez később ATP-áz enzimeken keresztül egyenlítődik ki, miközben az ADP-ből és foszforból ATP-t szintetizál. Végeredményben a tápanyag energiája az ATP pirofoszfát kötésében tárolódik. E folyamat a mitokondriumokban játszódik le. Másik tipikus ilyen folyamat a fotofoszforiláció, mely a zöld növények kloroplasztiszaiban történik, itt az elsődleges energiaforrás az abszorbeált fény.

Bár igazoltnak tekinthető, hogy az energia átalakítása és tárolása a MITCHELL-hipotézis szerint történik, az egyes részfolyamatok pontos molekuláris mechanizmusa nem ismert. Világszerte nagy erőfeszítések történnek e bioenergetikai szempontból óriási fontosságú folyamatok felderítésére.

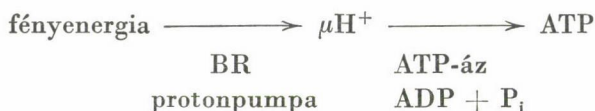
A Halobacterium halobium és a bakteriorodopszin jellemzése

Az utóbbi évtizedben fedezték fel, hogy a már régen ismert *Halobacterium halobium* az eddig ismertektől különböző, aránylag egyszerű, és a részfolyamatok tanulmányozása szempontjából „kellemes” energiaháztartással rendelkezik (14). A *Halobacterium halobium* erősen sós vízben élő baktérium. Nagy mennyiségben található tengermellékek sólepárló helyein, ahol a sókoncentráció igen nagy — e medencék gyakran jellemző piros színüket e bakté-

riumoktól kapják. Ez az egysejtű tápanyagban és oxigénben dús környezetben energiáját a tápanyag elégetésével, oxidatív foszforilációval nyeri. Ha azonban erre a körülmények nem kedvezőek, képes a fény energiájának hasznosítására is. A fényenergia átalakítására egy a sejtmembránban található fehérje-festék komplex, az úgynevezett bakteriorodopszin (BR) szolgál. Ez a fehérje nevét onnan nyeri, hogy szerkezetében és működésének sok részletében nagyon hasonló a szemben található rodopszinhoz (15). Alapvető részei a kb. 26 000 Dalton molekulasúlyú fehérje, és az ennek egy lizin aminosavjához kapcsolódó retinal molekula, a komplex kromofórja. E bakteriorodopszin molekulák a sejtmembrán egyes tartományaiban, az ún. bíbor membrán fragmentumokban koncentráltan helyezkednek el.

E bíbor membránok a BR-en kívül egyetlen más fehérjét sem tartalmaznak. A BR molekulák pedig e bíbor membránokban szigorú rendben, erősen rögzítetten, kétdimenziós hexagonális kristályrács rácpontjaiban helyezkednek el (1. ábra). A sejtmembrán egyéb részei tartalmazzák a többi működési egységet (légzési lánc, ATP-áz stb.).

Kísérletekkel kimutatták, hogy fény hatására a baktériumban ATP szintetizálódik, mely folyamat a következő lépésekben történik: az abszorbeált fény hatására a bakteriorodopszin protont pumpál a sejt belsejéből a sejten kívüli térbe, ezáltal a sejten belüli protonkoncentráció lecsökken, protonkoncentráció különbség alakul ki a membrán két oldala között. E különbség úgy szűnik meg, hogy a protonok ATP-ázon keresztül visszaáramlanak a sejten belülrre, miközben ATP szintetizálódik. Vagyis a fény energiája a protonok elektrokémiai energiájává, ez utóbbi pedig az ATP pirofoszfát kötésének energiájává alakult. Végül is a fotonok energiája a MITCHELL-elmélettel összhangban, két alapvető lépésben alakult kémiai energiává:



A *Halobacterium halobium* alapvető energiaszabályozásának sémája a 2. ábrán látható.

Az előzőekből is látható, hogy a *Halobacterium halobium* főleg egyszerűségénél fogva ideális objektum az alapvető bioenergetikai kutatások számára. A rajta kapott eredmények nagyban hozzájárultak a MITCHELL-féle kemiozmotikus hipotézis elfogadásához.

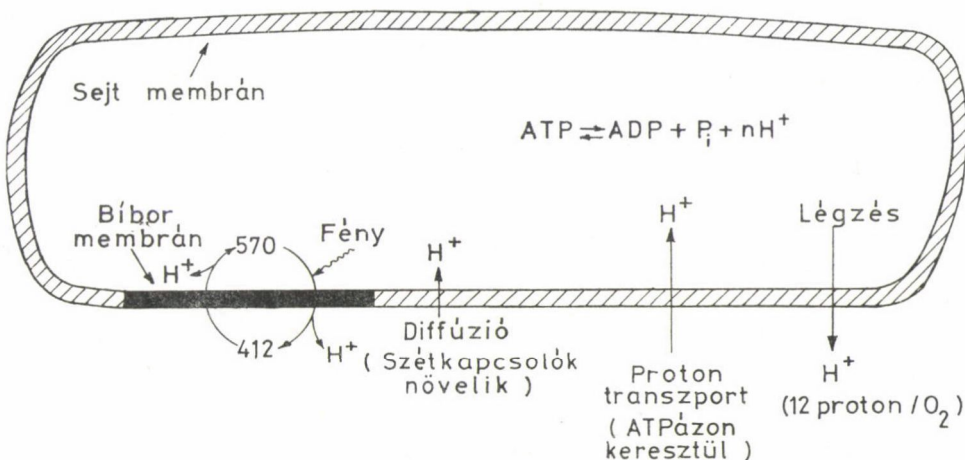
A BR rendszernek több, elméleti és gyakorlati szempontból igen fontos tulajdonsága van. Mint láttuk, a BR egy (felfedezésében) új biológiai fényenergia hasznosító rendszer, a klorofillal működőtől teljesen különböző szerkezettel és működéssel. Mivel itt egyetlen molekula egyetlen lépésben végzi a proton transzportot, logikus, hogy a pumpálás mechanizmusának részleteit, az általá-



1. ábra. A bíbormembrán röntgendiffrakciós vizsgálatokból rekonstruált kétdimenziós térképe. Egy rácspont körül három, egyenként 7 helixből álló bakteriorodopszin molekula helyezkedik el

nos törvényszerűségeket célszerű rajta vizsgálni. (Meg kell azonban jegyeznünk, hogy ennek az egyszerűségnek „ára” van: a BR rendszer kevesebbre is képes a fotoszintézisnél (pl. vízbontás nem történik, energiaátalakítási hatásfoka is kisebb).

A BR további, gyakorlati szempontból igen kellemes tulajdonsága, hogy a bíbor membrán fragmentumok könnyen izolálhatók, alapvető strukturális és funkcionális tulajdonságuk izolált állapotukban megmarad, és rendkívül



2. ábra. A *Halobacterium halobium* sejtmembránjának funkcionális vázlata

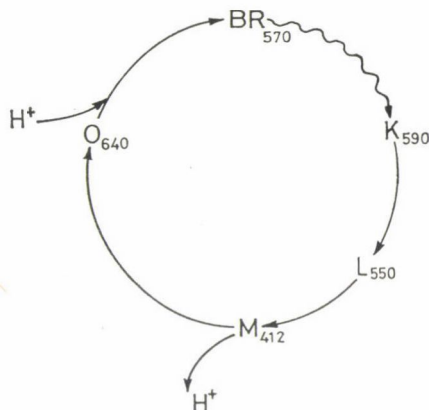
stabil: szobahőmérsékleten is akár hónapokig eltartható. A bíbor membrán fragmentumok a kvázi-kristályos szerkezetük révén alkalmasak arra, hogy krisztallográfiai módszerekkel vizsgáljuk szerkezetét: röntgen-, elektron- és neutrondiffrakciós vizsgálatokkal térbeli szerkezetét már igen jól feltérképezték (4) (1. l. ábra), így a bakteriorodopszin a gyakorlatilag legjobban ismert membrán fehérjévé vált. Ezen információk birtokában lehetőség nyílik a proton transzport részleteinek, egyes lépéseinek a kutatására, a pontos működési mechanizmus megismerésére. Valószínű, hogy a bakteriorodopszin lesz az első aktív transzport fehérje, amelynek pontos molekuláris működési mechanizmusát megismerjük.

A napenergia hasznosításának új kísérletei

További jelentőséget kölcsönöz a BR kutatásának az a tény, hogy napjainkban óriási erőfeszítéseket tesznek új energiaforrások kutatására. Az alaptudományos ismeretek és a technológia fejlődésével egyre több figyelem fordul a biológiai energiaforrások felé. E terület igen sokrétű, az ún. biomassza feldolgozásától a hidrogéntermelő baktériumok kutatásáig; a vizsgálatok jelenleg az alapvető folyamatok megismerésénél, az elméletileg sokat ígérő rendszerek gyakorlatba való átültetésének kísérleteinél tartanak. E rendszerek között előkelő helyet foglal el a bakteriorodopszin. Már ismertetett tulajdonságai alapján komoly remény van arra, hogy felhasználásával a napenergiát villamos energiává (az átpumpált protonok elektrokémiai potenciáljának elektromos részét felhasználva) alakító biológiai fénylemet szerkesszünk belőle, amely potenciálisan a gyakorlatban is használható energiaforrása válhat. Nyilvánvaló tehát, hogy a bakteriorodopszin protonpumpa működési mechanizmusának tisztázása mind alaptudományos, mind gyakorlati szempontból nagy jelentőségű.

A bakteriorodopszin fotociklusa

A BR funkciójának alapja az ún. fotokémiai ciklus, mely fogalom a fénnel való gerjesztés nyomán lejátszódó fotokémiai változások sorát jelöli. A BR alapállapotában 570 nm-nél abszorbeál. Elnyelt foton hatására, kb. 10 ps alatt új, 590 nm-nél abszorbeáló nagy energiatartalmú formába megy át, e forma ezután energiáját több lépésben, termikus gerjesztésű reakciók nyomán veszti el visszajutva alapállapotába — innen a fotokémiai ciklus elnevezés. Az egyes lépések nyomán különböző hullámhossznál abszorbeáló ún. intermedierek alakulnak ki, melyek elnevezései a következők. A már említett első termék az ún. K forma, ez szobahőmérsékleten kb. 5 μ s alatt az L formába jut ($\lambda_{\max} = 520$ nm) ezt követi az M forma ($\tau \sim 80 \mu$ s, $\lambda_{\max} = 410$ nm), ezt az O ($\lambda \sim 8$ ms, $\lambda_{\max} = 640$ nm), mely $\tau \sim 3$ ms alatt visszaalakul BR-á (5, 6) (3. ábra).



3. ábra. A bakteriorodopszin fotociklusának a vázlata

E fotokémiai ciklus során történik a proton pumpálása úgy, hogy a ciklus első felében proton hagyja el a bíbor membránt az extracelluláris oldalon [az $L \rightarrow M$ vagy az $M \rightarrow O$ átmenet során — erre vonatkozóan ellentmondóak az irodalmi adatok (12)], majd az $O \rightarrow BR$ átmenet során protont felvéve a sejten belülről helyreáll a kiinduló állapot. Általánosan elfogadott vélemény, hogy a pumpált proton eredete a retinált és a fehérjét összekapcsoló Schiff-bázis ($C = N$ kötés) nitrogénje, ezen alapállapotban van egy kompenzálatlan proton, mely a ciklus során leválik (10). Legújabban olyan eredmények jelentek meg, melyek szerint egy ciklus során két proton is átpumpálódhat — a második proton eredete bizonytalan (19).

A fotociklus lefolyásának módosítása fény gerjesztéssel

A fotociklus tanulmányozása során kiderült, hogy az egyes intermedierek gerjesztése nyomán lefolyása megváltozhat. A köztes termékek nagy része fényérzékenynek bizonyult abban az értelemben, hogy gerjesztés nyomán rajtuk is fotokémiai reakciók zajlanak le, melyek útja nem egyezik meg az illető intermedierek termikus reakcióival. E reakciók közös tulajdonsága, hogy a fény gerjesztés nyomán a BR_{570} alapállapotba való visszatérés sokkal gyorsabban és más úton zajlik le, mint a ciklus sötétreakciói révén.

OESTERHELT és mtsai egy korai munkájukban azt találták (16), hogy a bíbor membránok éteres-vizes szuszpenziójában, ahol az M forma élettartama igen nagy, az intermediert az őt gerjesztő kék fénnel megvilágítva az igen gyorsan visszatér a BR_{570} alapállapotba.

A folyamatot később normál körülmények között flash-fotolízis módszerrel KALISKY és mtsai részleteiben vizsgálták (5). Megállapították, hogy kék fény gerjesztés nyomán igen gyorsan, $t < 10$ ns alatt kialakul egy kissé a kék

fele, 405 nm-re eltolódott abszorpciós maximumú termék, mely ezután termikus reakcióval, szobahőmérsékleten kb. 200 ns időállandóval jut a BR 570 alapállapotba.

LITVIN és BALASOV (11) mély hőmérsékletű spektroszkópiai kísérletekkel úgy találták, hogy a termikus visszaalakulás több lépésben, még két intermedieren keresztül történik.

Modellrendszerek a BR funkciójának kutatásában

A protonpumpa működése előnyösen tanulmányozható modellrendszerekben, ahol az egyes folyamatok tisztán, zavaró körülményektől mentesen vizsgálhatók. Gyümölcsöző módszer a modellmembránok alkalmazása, sok alapvető probléma tisztázására nyílt általuk lehetőség. E módszerek lényege, hogy létrehozunk a sejtmembrán egy modelljét két elektrolit között, és ebbe megfelelő módon beépítjük a bakteriorodopszint. Irányított beépülés esetén fény hatására proton transzportálódik a membránon keresztül, és proton koncentráció különbség mérhető a membrán két oldala közt. Ilyen jellegű rendszereken sikerült közvetlenül bizonyítani, hogy a bakteriorodopszin önmagában aktív protontranszportra képes (20). Az egyidejű elektromos membrán potenciál ébredését is bizonyították (7).

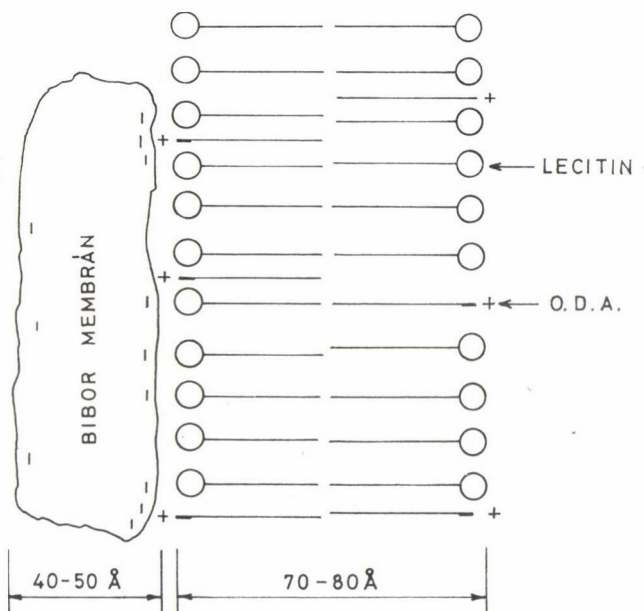
A bakteriorodopszin tartalmú BLM

Igen jó, a bakteriorodopszin protonpumpa tanulmányozásában használható modellrendszert dolgozott ki DANCSEHÁZY és KARVALY (2). A bakteriorodopszint a biológiai membránok egyik legjobb modelljének tartott bimolekuláris lipid membránba építették be. A beépítést elektrosztatikus vonzás kihasználásával érték el — a negatív felületi töltésű bíbor membrán darabkák az oktadecilamin hozzáadásával elektromosan pozitívvá tett BLM-re feltapadnak.

A rendszer a nettó protontranszport megjelenéséhez szükséges aszimmetriáját úgy nyeri, hogy a bíbor membrán fragmentumokat csak a BLM egyik oldali fürdető oldalába viszik, és ezen az oldalon (a bíbor membrán felületi töltés — aszimmetriája révén) a membrán fragmentumok irányítottan helyezkednek el a BLM felületén (4. ábra).

E modellrendszer fotoelektromos aktivitást mutat, fénnel megvilágítva fotoáramot és fotofeszültséget kelt, mely bizonyítottan a bimolekuláris lipid rétegre tapadt bakteriorodopszin gerjesztése révén ébred (3).

KARVALY és DANCSEHÁZY megfigyelték (6), hogy ha a bakteriorodopszint fő abszorpciós sávjában gerjesztő zöld megvilágító fényre kék fényt szuperponáltak, a hozzáadott kék fény a zöld fény által keltett fotofeszültség csökkenését okozta nagy zöld fényintenzitás esetén.



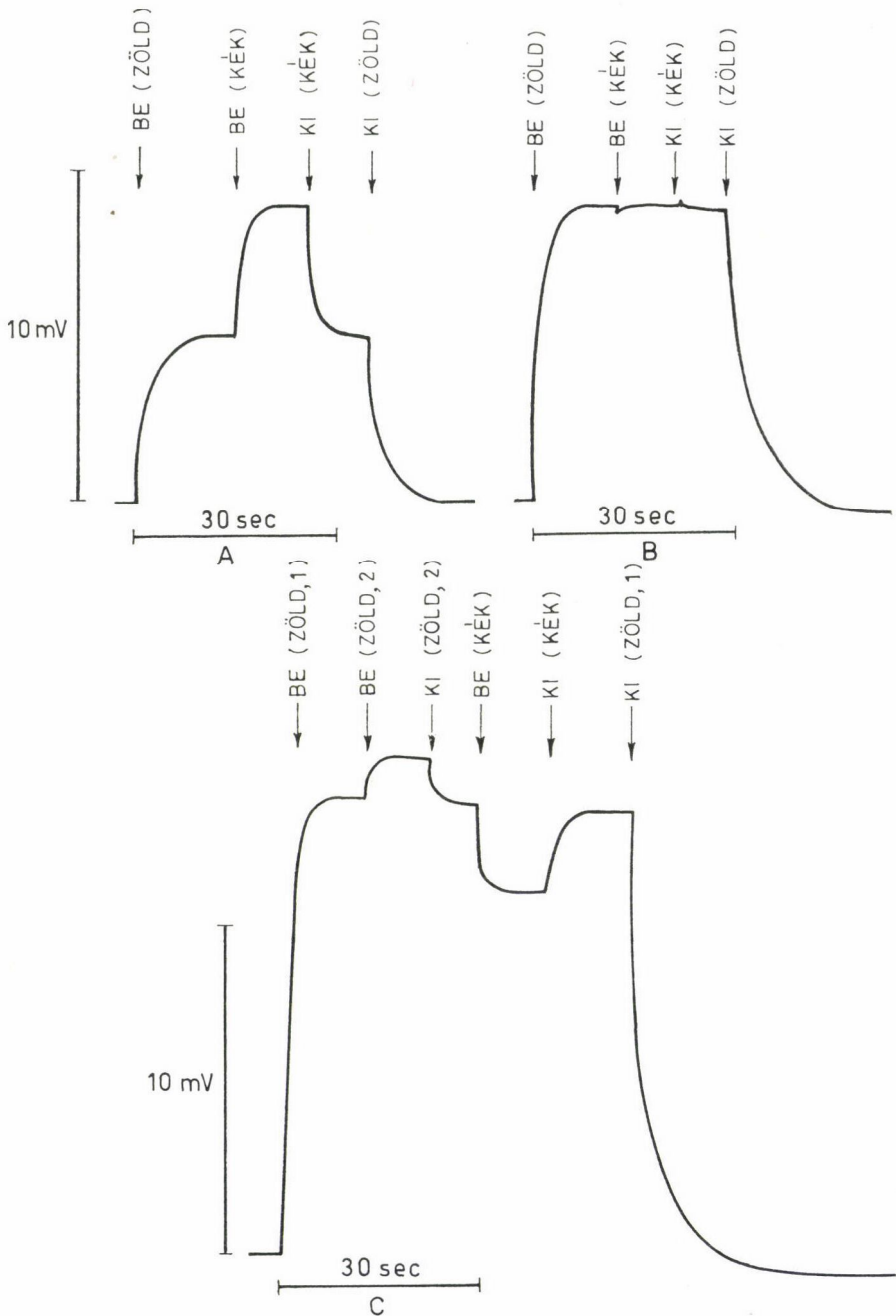
4. ábra. A bakteriorodopszin tartalmú biomolekuláris lipid membrán sémája

A jelenséget úgy magyarázták, hogy a kék fény a zöld fény által létrehozott M formát gerjeszti, és az M forma gerjesztésével módosított fotokémiai ciklus során elmarad a protontranszport.

A fotofeszültség generálódásának és a kék fény hatásának részletes vizsgálata a BR-BLM rendszeren

A protonpumpa pontos működésének megismerésére részletes kísérleti és elméleti vizsgálatokat végeztünk (17). Kísérleti objektumunk a már leírt bakteriorodopszin tartalmú BLM volt. A biomolekuláris lipid membránt tojáslecitinből hoztuk létre két elektrolitot elválasztó teflon fal 1,5 mm átmérőjű körkeresztmetszetű lyukán. A membrán pozitív felületi töltését a membránképző oldathoz a lecitinhez képest 1:8 arányban kevert oktadecilamintól nyerte. A membrán kialakulása után az egyik oldalhoz bíbor membrán fragmentumokat adva kialakult a fotoelektromosan aktív BR-BLM. A membrán feszültségét az elektrolitba merülő kalomel elektródákkal érzékeltük, és nagy bemenő impedanciájú Keithley 604 típusú elektrométerrel mértük.

A membrán gerjesztése kétutas optikai rendszerrel történt, egyidejűleg két, egymástól függetlenül változtatható fénnel világíthattuk meg a mintát. Nagynyomású 200 W-os higanylámpák megfelelő vonalait üvegszűrőkkel kivágva nyertük a gerjesztéshez szükséges zöld (565 nm) és kék (405 nm) fényt.



5. ábra. A BR-BLM fotofeszültség-válasza egyidejű zöld és kék fény gerjesztés esetén. A) $I_Z = 2,2 \times 10^{20}$ foton/m²s; $I_K = 10^{22}$ foton/m²s B) $I_Z = 8 \times 10^{20}$ foton/m²s; $I_K = 10^{22}$ foton/m²s C) $I_Z(1) = 6 \times 10^{21}$ foton/m²s; $I_Z(2) = 3 \times 10^{21}$ foton/m²s $I_K = 10^{22}$ foton/m²s

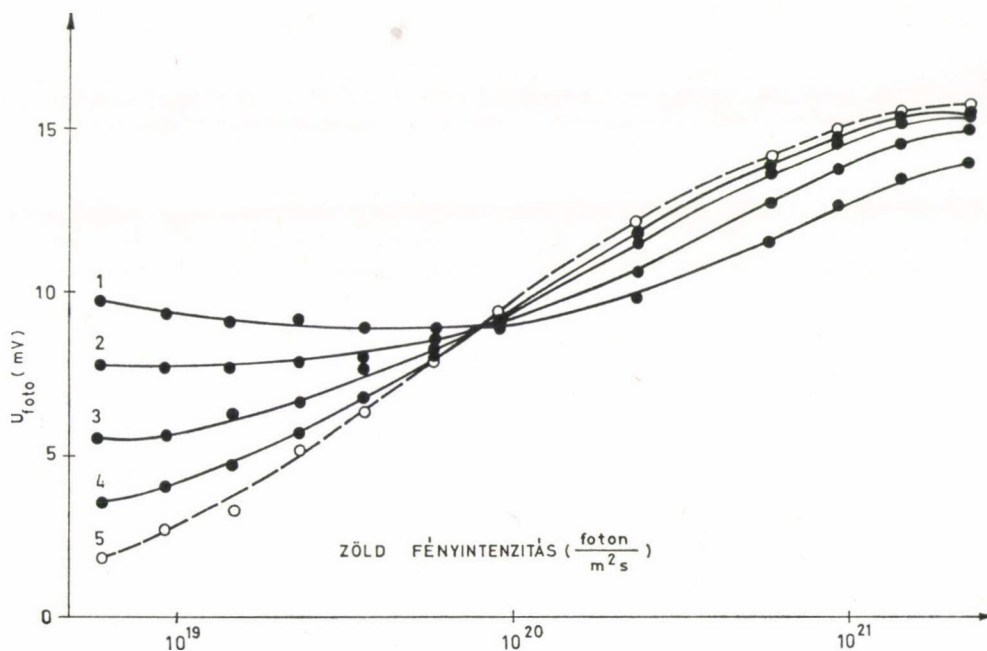
A membránt tetszőleges hullámhosszú fénnel megvilágítva fotoelektromos aktivitást mutat. A fotoválasz jellege azonos, csak amplitúdója függ természetesen a bakteriorodopszin abszorpciós spektrumának megfelelően a hullámhossztól.

Ha a bakteriorodopszint abszorpciós maximumában gerjesztő zöld fényre kék fényt szuperponálunk, a mért fotofeszültség megváltozik (5. ábra). Kis zöld fényintenzitás esetén a kék fény a fotofeszültség növekedését okozza. Egy bizonyos zöld intenzitás (5B. ábra) fölött azonban a hozzáadott kék fény a fotofeszültség csökkenését idézi elő (5C. ábra).

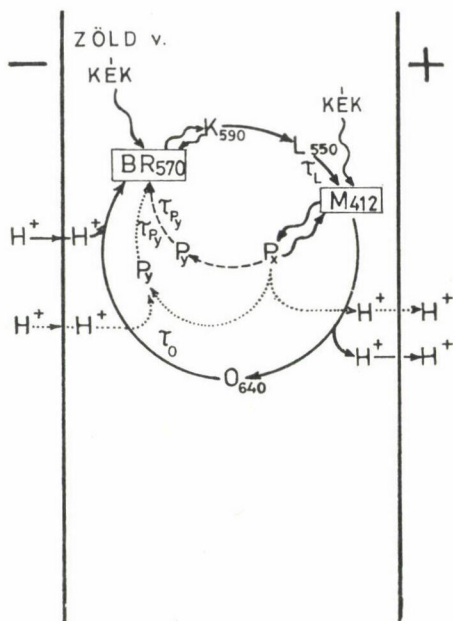
6. ábránk mutatja, hogyan függ a fotofeszültség a zöld, illetve kék fényintenzitástól; szembetűnő, hogy az a zöld fotonsűrűség, amelynél a kék fény okozta változás előjelet vált, nem függ a kék fény intenzitásától.

A jelenség kvalitatív magyarázata az, hogy nagy zöld fényintenzitáson az M forma feldúsul, a kék fény ekkor elsősorban ezt gerjeszti, és az M intermediér gerjesztése nyomán úgy zárul a fotociklus, hogy akkor protontranszport nem történik.

A kvantitatív leírás alapjául a fotociklus kinetikai tulajdonságai, illetve a protonpumpálásnak a ciklushoz kötése szolgál. A fotociklusnak a 7. ábrán bemutatott sémáját használjuk tárgyalásunkban, mely megegyezik a 3. ábrán



6. ábra. Az eredő fotofeszültség függése az egyidejű zöld és kék fény gerjesztés esetén a zöld fényintenzitástól, különböző konstans kék fényintenzitások mellett. A kék fényintenzitások az alábbiak: 1. $I_K = 10^{22}$ foton/m²s 2. $I_K = 2,7 \times 10^{21}$ foton/m²s 3. $I_K = 7,2 \times 10^{20}$ foton/m²s 4. $I_K = 2 \cdot 10^{20}$ foton/m²s



7. ábra. A fotociklus sémája, feltüntetve a protontranszport egyes lépéseit. Az ábra tartalmazza az M forma gerjesztésével induló új reakcióút két lehetséges típusát: -----: nem történik protontranszport: történik protontranszport

mutatottal, kiegészítve az M gerjesztésével induló új reakcióúttal LITVIN és BALASOV nyomán (11). E reakcióutat azért „kettőzzük meg”, mert nem tudjuk, az összes ilyen úton elmarad-e a protontranszport, vagy csak részben (kvalitatív megfontolásokkal ez nem dönthető el, előfordulhat, hogy bizonyos mértékben ez a reakció is hozzájárul a pumpáláshoz). Feltesszük, hogy ezen reakcióutak η hányadában gátlódik a protonpumpa, ekkor értelem szerűen az aktív lépések hányada $1-\eta$.

Ekkor a fotociklus az alábbi differenciál-egyenletrendszerrel írható le:

$$\frac{d[\text{BR}]}{dt} = -(I_Z \sigma_Z + I_K \sigma_K) [\text{BR}] + \frac{1}{\tau_P} [P_Y] + \frac{1}{\tau_P} [P'_Y] + \frac{1}{\tau_M} [M] \quad (1)$$

$$\frac{d[L]}{dt} = (I_Z \sigma_Z + I_K \sigma_K) [\text{BR}] - \frac{1}{\tau_L} [L] \quad (2)$$

$$\frac{d[M]}{dt} = \frac{1}{\tau_L} [L] - I_K \sigma_K^* [M] - \frac{1}{\tau_M} [M] \quad (3)$$

$$\frac{d[P_Y]}{dt} = \eta I_K \sigma_K^* [M] - \frac{1}{\tau_P} [P_Y] \quad (4)$$

$$\frac{d[P']_Y}{dt} = (1 - \eta)I_K\sigma_K^*[M] - \frac{1}{\tau_P}[P'_Y] \quad (5)$$

és

$$[BR]_0 = [BR] + [L] + [M] + [P_Y] + [P'_Y], \quad (6)$$

ahol I_Z és I_K a zöld és kék fény intenzitása; σ_Z , σ_K és σ_K^* a hatásos abszorpció-hatáskeresztmetszetek a BR_{570} formának zöld fényre, illetve kék fényre és az M formának a kék fényre. $[BR_{570}]_0$ a mért protontranszportban résztvehető bakteriorodopszin koncentrációja; $[BR_{570}]$, $[L_{550}]$, $[M_{410}]$, $[P_Y]$ és $[P'_Y]$, illetve τ_{BR} , τ_L , τ_M , τ_P pedig az egyes intermedierek koncentrációi és időállandói. Egyenleteinkben feltettük, hogy $\tau_P = \tau_P$, és csak a domináns reakciókat vettük figyelembe.

Ezen egyenletrendszert megoldva az M_{412} forma egyensúlyi koncentrációjául az alábbi adódik:

$$[M] = [BR]_0 \frac{I_Z\sigma_Z + I_K\sigma_K}{1 + \tau_L(I_Z\sigma_Z + I_K\sigma_K)} \times \frac{1}{\frac{I_Z\sigma_Z + I_K\sigma_K}{1 + \tau_L(I_Z\sigma_Z + I_K\sigma_K)}(1 + \tau_P I_K\sigma_K^*) + \frac{1}{\tau_M} + I_K\sigma_K^*} \quad (7)$$

Az egység idő alatt a membránon átpumpált protonok számát úgy kapjuk meg, hogy meghatározzuk a hatásos úton zárult fotociklusok másodpercenkénti számát (f):

$$f = \frac{1}{\tau_M} [M] + (1 - \eta)I_K\sigma_K^*[M], \quad (8)$$

ahol η a korábban bevezetett hatásfok-paraméter.

Ezen irányított protontranszport létrehoz egy $2\Delta c$ koncentrációkülönbséget a membrán két határrétege között, amely passzív vissza-diffúziót hajt. Reális feltételezés szerint e visszáram arányos a $2\Delta c$ koncentrációval egy, a membránra jellemző α arányossági tényezővel (mely a membrán proton-permeabilitásától stb. függ). Egyensúlyi állapotban e két irányban folyó áramok egyenlőek, így

$$\frac{1}{\tau_M} [M] + (1 - \eta)I_K\sigma_K^*[M] = \alpha\Delta c, \quad (9)$$

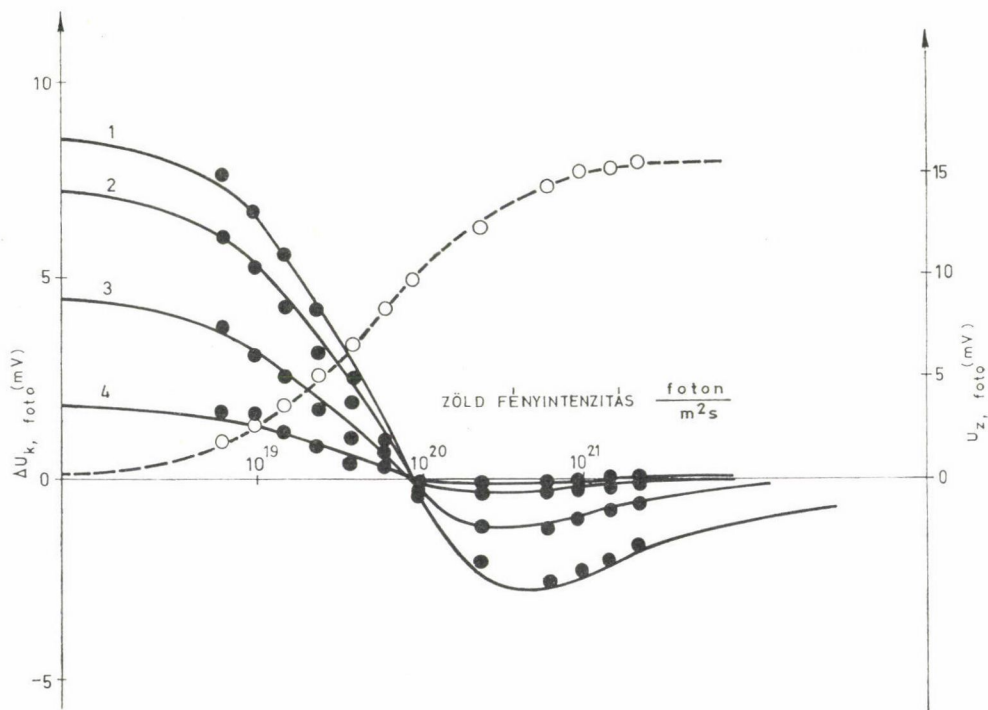
vagyis Δc arányos a membrán határrétegben felhalmozódott töltéssel (a membrán különböző oldalain különböző előjellel). Δc a membrán kapacitását tölti, és így a megjelenő fotofeszültség

$$U_{\text{foto}} = \frac{\beta}{2\alpha} \left(\frac{1}{\tau_M} + (1 - \eta)I_K\sigma_K^* \right) [M], \quad (10)$$

ahol β gyakorlatilag a membrán inverz kapacitása.

A kísérleti adatok összevetése a számításokkal

Amint az a (7) és (10) egyenletekből látszik, kifejezésünk tartalmazza a $[BR_{570}]_0 \frac{\beta}{2\alpha}$ amplitúdó faktort és a görbék karakterisztikus tulajdonságait megadó σ , τ , η molekuláris paramétereket. Az amplitúdófaktor egyes tagjainak az értéke nem ismert, így az illesztés során az amplitúdótól ilyen értelemben eltekintettünk, ezt megtehettük, mert a görbék lefutását a molekuláris paraméterek egyértelműen meghatározzák, egyértelmű illesztésre van lehetőség. Az irodalomból ismert $\tau_L = 30 \mu s$; $\tau_M = 10 ms$; $\sigma_Z = 3 \times 10^{-17} cm^2$ $\sigma_Z = 0.9 \times 10^{-17} cm^2$ és $\sigma_K^* = 1.5 \times 10^{-17} cm^2$ értékeket használtuk (6), és a τ_P és η értékeket változtattuk az illesztés során. Eredményünket a 8. ábra mutatja.



8. ábra. A modellszámítás illesztése a mérési eredményekhez. A zöld fény indukálta fotofeszültség ($U_{Z, \text{foto}}$) függése a zöld fény intenzitásától ($\circ$: mért, -----: számított) és a kék fény okozta fotofeszültség-változás ($\Delta U_{K, \text{foto}}$) függése a zöld fény intenzitásától ($\bullet$: mért, —: számított) különböző állandó kék fényintenzitások esetén

Megállapítható, hogy modellünk jól leírja mind az alapfotojel változását a zöld fényintenzitás függvényében, mind a kék fény teljes hatását. Ezek szerint magyarázatunk a fotofeszültség ébredésére, valamint a kék fény gátló mechanizmusára helyes.

Az ábra illesztése $\tau_P = 75 \mu s \pm 30\%$ és $\eta = 1-5\%$ értékekkel történt, ebből a pumpa további tulajdonságaira következtethetünk.

1. Az M_{412} forma gerjesztésével indított reakcióút, mely a BR_{570} gyorsabb regenerálódást eredményezi, $75 \mu s$ időállandójú sebességmeghatározó termikus folyamattal rendelkezik.

2. Mindazon fotociklusokban, amelyek az M_{412} forma gerjesztése nyomán záródnak, elmarad a protontranszport.

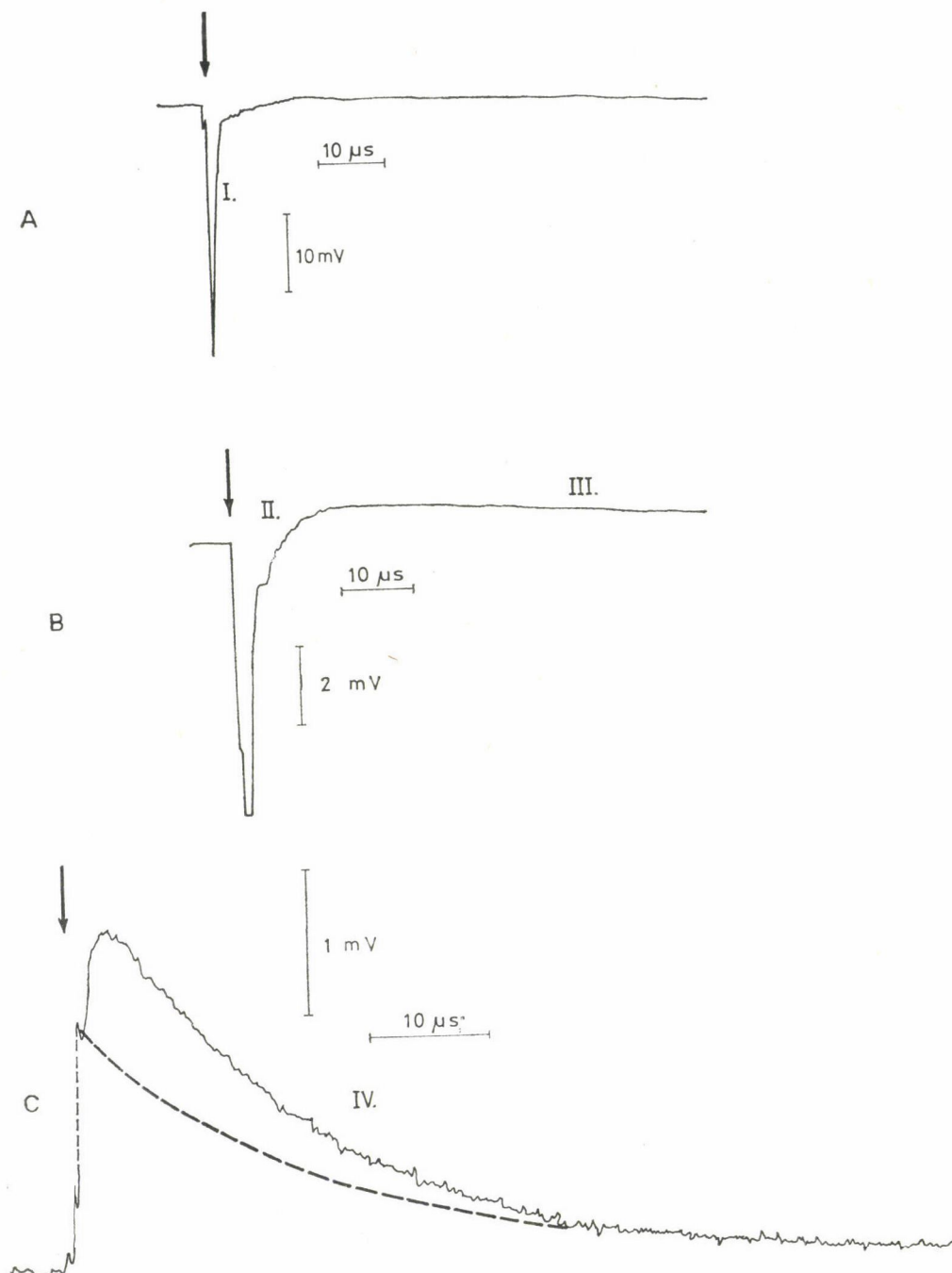
A kék fény gátló hatása két konkrét módon történhet. Amennyiben az M_{412} forma kialakulásakor a proton az extracelluláris oldalon már felszabadult, kék fény hatására a protont visszaveszi, és végül is nettó transzport nem történik.

Ha az M_{412} forma kialakulásakor a proton még a fehérjén belül van, a kék gerjesztés nyomán valószínűleg le sem adódik, hanem még a molekulán belül visszakerül eredeti helyére.

Kísérleti módszerünk, illetve modellünk e kérdés megválaszolására nem képes, eldöntésére más módon nyílt lehetőség.

Eltolódási áramok vizsgálata bíbor membránok orientált szuszpenzióján

Hogy a protontranszport részleteiről további információkat szerezzünk, olyan modellrendszert dolgoztunk ki, melyben a bakteriorodopszin tisztán, segédrendszer (pl. hordozó membrán) nélkül, kvantitatívan jól értékelhetően vizsgálhatjuk. Módszerünk az adott lehetőséget, hogy kiderült, a bíbor membrán fragmentumok permanens elektromos dipól momentummal rendelkeznek, így elektromos térben orientálhatók. Az egyes bakteriorodopszin molekuláknak a bíbor membrán normálisába mutató dipól momentumuk van, és mivel a membrán fragmentumokban a molekulák szigorúan rendezetten, azonos orientációban helyezkednek el, dipól momentumaik összegződnek. A bíbor membránok átlagos dipól momentuma $6 \cdot 10^{-23} \text{ Cm}$ így már $10 \frac{\text{V}}{\text{cm}}$ nagyságrendű (tehát a biológiai membránokon fellépőkhöz képest jelentéktelenül kicsiny) elektromos térrel gyakorlatilag 100%-osan orientálhatók. A membrán szuszpenzió orientált állapota meglehetősen hosszú ideig fenntartható ($\sim 10 \text{ s}$), így további vizsgálatok végzésére van rajta lehetőség (8). Mi ezen orientált rendszeren (amelynek tehát lényeges tulajdonsága, hogy a bíbor membránok „tisztá” vizes szuszpenziója, egyéb segéd rendszert nem tartalmaz) tanulmányoztuk a proton transzport lépéseit úgy, hogy egy gerjesztő fényimpulzus hatására megjelenő elektromos jeleket mértük. Az elektromos méréssel egyide-

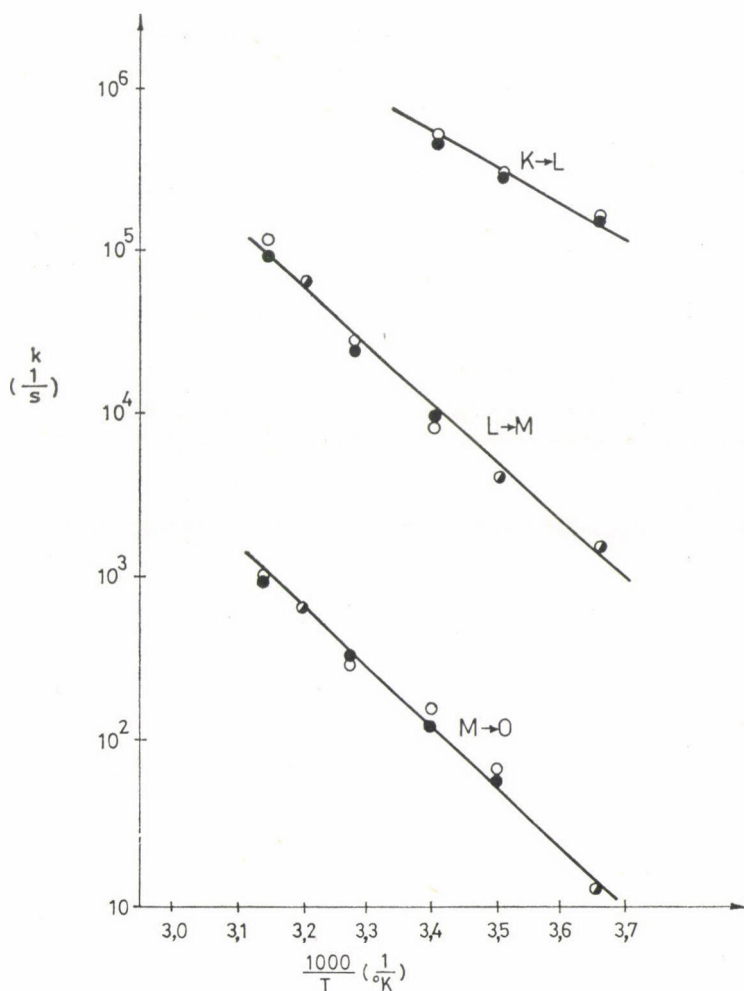


9. ábra. A bíbor membránok orientált szuszpenzióján fényimpulzus hatására megjelenő eltolódási áramjel a, b, c: A jel egyes komponensei

jűleg az egyes intermedierek karakterisztikus hullámhosszain figyelve az abszorpció időbeni változását követtük a fotociklus lefutását.

A mérési eljárás részleteit a (9) munkában ismertettük. Az orientált minta gerjesztésével többkomponensű elektromos jelet kapunk, az egyes karakterisztikus összetevőket a 9. ábránk mutatja.

Az elektromos jel első, negatív komponense követi a gerjesztő lézerpulzus lefutását, vagyis a folyamat jóval gyorsabb a rendszerünk időfelbontását limitáló fényimpulzus $1 \mu\text{s}$ tartamánál. Következésképpen, a fotociklus első, BR $\rightarrow$ K átmenetének (melynek időállandója szobahőmérsékleten 15 ps) feleltethető meg. A későbbi, jól mérhető kinetikájú folyamatoknak a foto-



10. ábra. Az elektromos és abszorpció-kinetikai jelek komponensei sebességének hőmérséklet-függése. ○: elektromos jel ●: abszorpciós jel

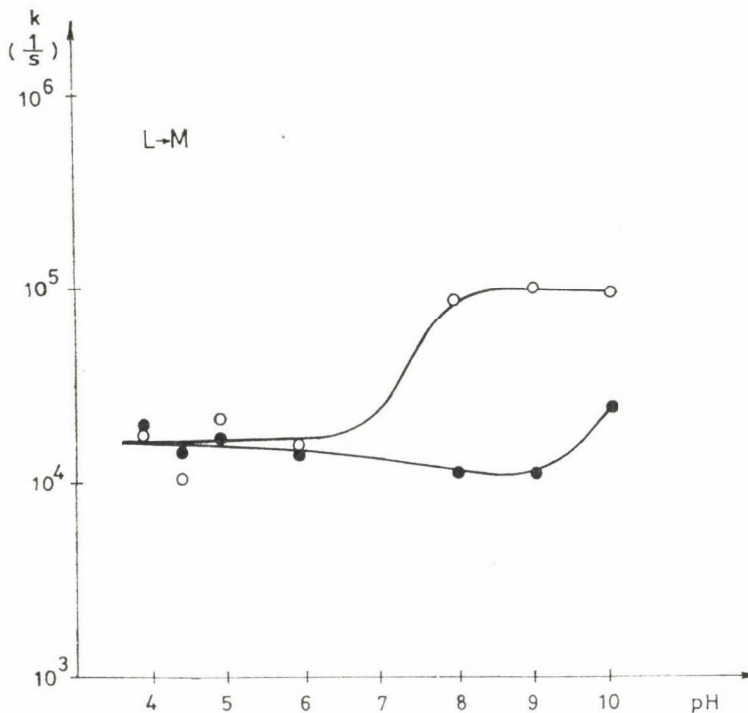
kémiai ciklussal való összehasonlítására meghatároztuk mintánkon az egyes intermedierek élettartamát abszorpció-kinetikai mérésekkel.

Meglepő módon azt találtuk, hogy az elektromos és abszorpció-kinetikai jelek azonos lefutásúak. Ezek szerint a II. komponens a $K \rightarrow L$ átmenetnek, a III. komponens az $L \rightarrow M$ átmenetnek, a IV. komponens pedig az $M \rightarrow O$ és $O \rightarrow BR$ átmeneteknek felel meg (a szaggatott vonal mutatja a IV. komponens összetevőit).

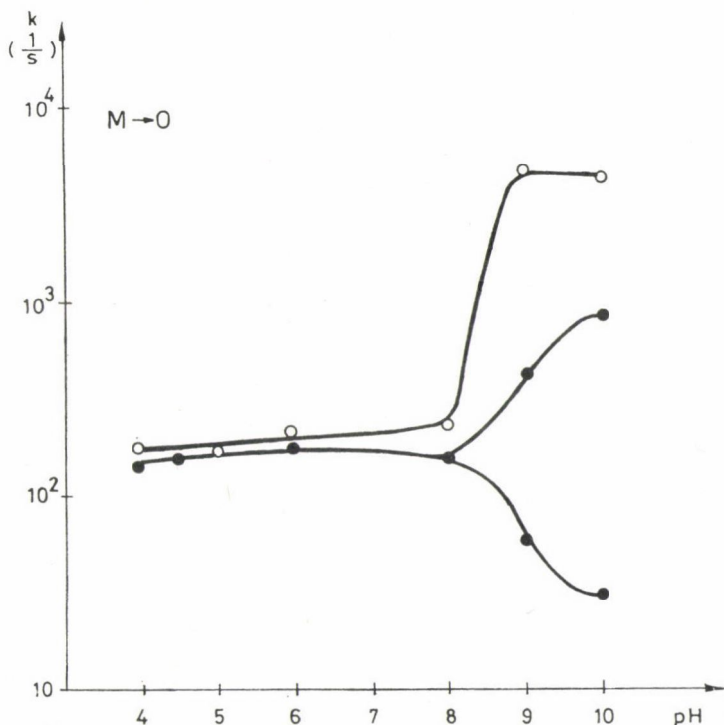
A hozzárendelést megerősítendő, megvizsgáltuk, hogyan függ az egyes jelkomponensek sebessége a hőmérséklettől. A kapott eredményeket a 10. ábra mutatja Arrhenius ábrázolásban, mely a megfeleltetést igazolja.

Tekintve, hogy a bakteriorodopszin protonpumpa elektromos jelei nagy valószínűséggel a protonok transzportjával függnek össze, vizsgáltuk, hogyan viselkedik a rendszer különböző pH értékeken. Ismert, hogy a pH változása befolyásolja a fotociklus lefutását, így érdemes a kinetikai értékeket összehasonlítani.

A mérések eredményeit a 11. és 12. ábra foglalja össze. A $K \rightarrow L$ átmenet, illetve a hozzá tartozó elektromos jel a vizsgált pH-tartományon a hibahatáron belül nem változik. Az $L \rightarrow M$, illetve az $M \rightarrow O$ átmenet lefutásában azonban mind az optikai, mind az elektromos mérések tanúsága szerint jelentős válto-



11. ábra. Az $L \rightarrow M$ átmenethez tartozó elektromos (○) és abszorpció-kinetikai (●) jelek pH-függése



12. ábra. Az $M \rightarrow O$ átmenethez tartozó elektromos (○) és abszorpció-kinetikai (●) jelek pH-függése

zások történnek. A fotociklus $L \rightarrow M$ átmenete, amelyet abszorpció-kinetikai méréssel határozzunk meg, pH = 9–10 között kissé felgyorsul. A hozzá tartozó elektromos jel pH = 8-as értékig együtt halad az optikai jellel, pH = 8-tól a nagyobb értékek felé közel nagyságrenddel gyorsabbá válik. Ezek szerint a sebességek különböző pH-függése révén az elektromos és abszorpció jel az $L \rightarrow M$ átmenet esetében pH = 8-nál, illetve előlött szétcsatolódik. Lényegileg hasonló a helyzet az $M \rightarrow O$ átmenet esetében. Alacsony értékeken, pH = 4 és 8 között az abszorpció és elektromos jelek együtt futnak, és nem mutatnak pH-függést. pH = 8-as érték fölött az M forma bomlása kétfázisú exponenciálissal írható le. A fotociklus kinetikájának e változásakor ez esetben is a jelek szétcsatolódása következik be, hiszen az elektromos jel nagymértékben, nagyságrendnél gyorsabban felgyorsul.

Az elektromos jelek értelmezésének alapja, hogy jelünk az orientált molekulákban egy irányban, egyszerre elmozduló töltések által keltett eltolódási áram. Kvantitatívan a (9)-ben leírtak szerint értékelhetők adataink. Az egyes lépésekben történő töltés elmozdulásokat az 1. táblázat mutatja:

Tekintve, hogy $\Sigma d_i = 5$ nm, mely a membrán-fragmentum vastagságával egyezik meg, jelünket egy töltésnek a membránon keresztüli transzportjával

1. táblázat

A fotociklus egyes lépéseiben történő
töltésmozdulások a bakteriorodopszin
molekulában

Átmenet	$d_l/2$ (nm)
K → L	-0,15
L → M	+0,5
M → O	+3,1
O → BR	+1,5

kell értelmeznünk. A bakteriorodopszin protont pumpál a fotociklus során, így nyilvánvalóan az eltolódási áram a protontranszport egyes lépéseit tükrözi.

Így az e modellrendszeren a protontranszportról nyert új információk továbblépést jelentenek a bakteriorodopszin tartalmú bimolekuláris membránon kapott eredményekhez képest: a stacioner viselkedés megértésén túl az egyes részlépésekre is fény derült. A legfontosabb megállapítás, hogy a proton transzlokálása diszkrét lépésekben történik, és e lépések fiziológias körülmények között a fotociklus egyes reakcióival szigorúan együtt zajlanak le. A proton az egyes állapotokban valószínűleg a fehérje bizonyos proton megkötésére képes oldalláncain ül, és az átmenetek ezen oldalláncai közti átugrását jelentik.

A nagy pH értékeken megfigyelt hatás, az optikai és elektromos jelek szétválása, így nagy valószínűséggel azzal függ össze, hogy az illető (L és M) állapotokban a proton akceptor-donor csoportok protonfelvevő képessége változik meg, így a protontranszport sem tud a normális módon lezajlani. Tekintve, hogy a jelek szétválása pH = 8 körül történik, valószínű, hogy e lépésekben a hasonló pK értékű tirozin oldallánc vesz részt a proton transzportjában.

A proton mozgása által keltett eltolódási áram révén ez a korábban említett kérdés is megválaszolható volt, hogy kék fénnel gerjesztve az M formát, a proton még a membránon belülről vagy a membránon kívülről vevődik vissza, meggátolva a protontranszportot. Az 1. táblázatunkból látható, hogy a proton az M állapot elérésekor az eredeti (a membrán citoplazma felőli harmadában levő) helyéről még csak 0,5 nm-t haladt az extracelluláris oldal felé. Így az M gerjesztésekor a kiinduló állapot úgy érhető el, hogy a proton visszatér eredeti helyére anélkül, hogy a membrán szélét elérte volna. Ezt kísérletesen is igazoltuk (9, 18).

Összefoglalásként megállapíthatjuk, hogy alkalmazott módszereink a protontranszport sok részletének feltárására adtak lehetőséget. Ezenkívül az eljárások a későbbiekben alkalmasak lehetnek más, töltött részecskéket (különböző ionokat) transzportáló fehérjék működésének vizsgálatára.

A leírt munkában közvetlenül részt vettek Keszthelyi Lajos és Dancsházy Zsolt, nekik ezúton mondok köszönetet.

IRODALOM

1. APPLEBURY, M., PETERS, K. és RENTZEPIS, P.: *Biophys. J.* **15**, 375 (1978).
2. DANCShÁZY, Zs. és KARVALY, B.: *FEBS Lett.* **72**, 136 (1976).
3. DANCShÁZY, Zs., ORMOS, P., DRACHEV, A. és SKULACHEV, V.: *Biophys. J.* **24**, 423 (1978).
4. HENDERSON, R. és UNWIN, P.: *Biophys. Struct. Mech.* **3**, 121 (1977).
5. KALISKY, O., LACHISCH, U. és OTTOLENGHY, M. **28**, 261 (1978).
6. KARVALY, B. és DANCShÁZY, Zs.: *FEBS Lett.* **76**, 36 (1977).
7. KAYUSHIN, L. és SKULACHEV, V.: *FEBS Lett.* **72**, 136 (1974).
8. KESZTHELYI, L.: *BBA* **598**, 429 (1980).
9. KESZTHELYI, L. és ORMOS, P.: *FEBS Lett.* **109**, 189 (1980).
10. LEWIS, A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **71**, 4462 (1974).
11. LITVIN, F. és BALASOV, S.: *Biofizika* **22**, 1111 (1977).
12. LOZIER, R., BOGOMOLNI, R. és STOECKENIUS, W.: *Biophys. J.* **15**, 955 (1975).
13. MITCHELL, P.: *Nature* **191**, 144 (1961).
14. OESTERHELT, D. és STOECKENIUS, W.: *Nature* **233**, 149 (1971).
15. OESTERHELT, D. és STOECKENIUS, W.: *Proc. Natl. Acad. Sci. US* **70**, 2853 (1973).
16. OESTERHELT, D. és HESS, B.: *Eur. J. Biochem.* **37**, 316 (1973).
17. ORMOS, P., DANCShÁZY, Zs. és KARVALY, B.: *BBA* **503**, 304 (1978).
18. ORMOS, P., DANCShÁZY, Zs. és KESZTHELYI, L.: *Biophys. J.* **31**, 207 (1980).
19. ORT, D. és PARSON, W.: *Biophys. J.* **25**, 341 (1979).
20. RENTHAL, R. és LÁNYI, J.: *Biochemistry* **10**, 2136 (1976).