

MEMBRÁNHÓZ KÖTÖTT FEHÉRJÉK MŰKÖDÉSE

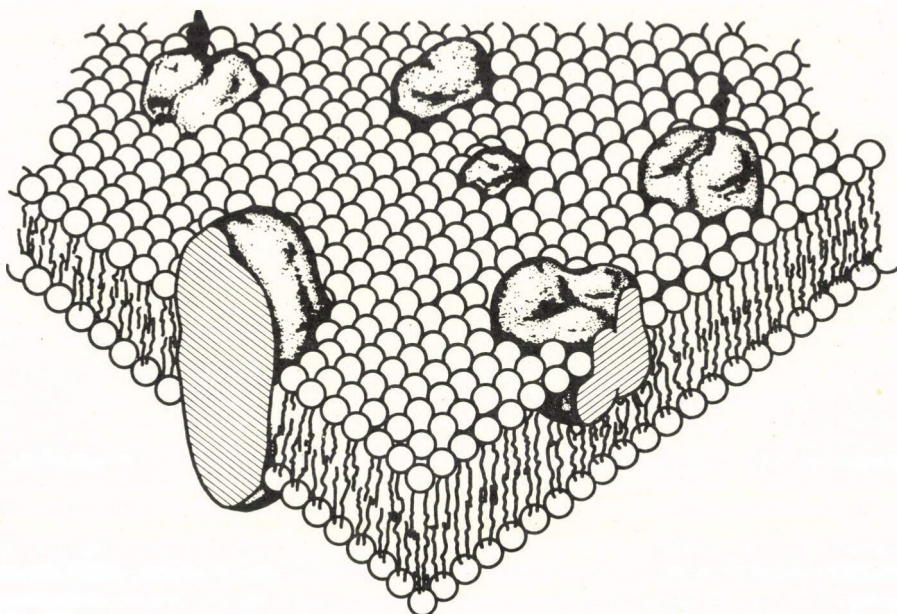
KESZTHELYI LAJOS

Szegedi Biológiai Központ, Biofizikai Intézet és Központi Fizikai Kutató Intézet,
Budapest

1. Bevezetés

A sejtek életjelenségeiben különlegesen fontos szerepet töltenek be a sejteket bezáró és a sejtek belső alkotórészeit határoló membránok. Egyes vélemények szerint (pl. LURIA [11]), a gének és a génműködés tanulmányozásán túlmenően nincsen olyan biológiai probléma, amely nagyobb kihívást jelentene a kutatók számára, mint a membránok különböző és titokzatosnak látszó tulajdonságainak a megfejtése. Elég itt utalnunk arra, hogy a sejteket határoló membránok teszik lehetővé, hogy a sejtben a gének megfelelő, többé-kevésbé zárt környezetben működhessenek. A sejt a membránon keresztül érintkezik környezetével, az anyagcserében résztvevő anyagok a membránon áramolnak be és ki. A membránok lényeges szerepet játszanak a sejtek közötti információ cserében. Membránokon történik a fényenergia átalakítása az élőszervezetek számára nélkülözhetetlen kémiai energiává, és a fotoszintézisből nyert táplálék molekulákban felhalmozott energiát is membránhoz kapcsolódóan működő rendszerek dolgozzák fel ATP molekulákká. Membránok fogják fel az izmok mozgatásához érkező jelzéseket és alakítják át olyan parancsá, amelyre az izmok munkát végeznek.

A membránok a sokféle feladatot megfelelő specializálódás révén képesek ellátni. Szerkezetükről mai képünk a következő ún. fluid mozaik modell [34], (1. ábra): lipid kettős rétegbe különböző fehérjék (enzimek) vannak beágyazva, amelyek átérhetnek mindkét oldalra, vagy csak a belső, vagy csak külső oldalon közelíthetők meg, további fehérjék tapadhatnak a külső, vagy belső oldalhoz. A fehérjék a lipidvázban, amelyet 10–50 cpoise viszkozitású folyékony közegnek tekinthetünk, rotációs és laterális diffúziós mozgást végezhetnek [4]. A sokféle feladat ellátása ezért lehetséges, mert a lipid váz összetétele, mind a beépült, illetve társult fehérjék (enzimek) fajtája membránról membránra különböző. Egy-egy meghatározott funkció ellátásában pontosan meghatározott enzimrendszerek vesznek részt. A meghatározottság az enzimek típusára és többé-kevésbé a lipidvázhoz vonatkoztatott térbeli elhelyezkedésükre vonatkozik. A továbbiakban egyetlen típusú membránrendszerrel, az energia átalakító membránrendszerekkel foglalkozunk csupán.



1. ábra. A Singer—Nicolson-féle fluid mozaik membrán modell. A membrán vázát lipid-molekulákból álló kettős réteg alkotja. Ebbe ágyazódnak a fehérjék

2. Energia átalakító membránrendszerek

Két fő típust különböztetünk meg:

- a) a fényenergiát átalakító rendszerek (fotoszintetikus membránrendszerek),
- b) táplálékban lévő energiát átalakító membránrendszerek (oxidatív foszforiláció).

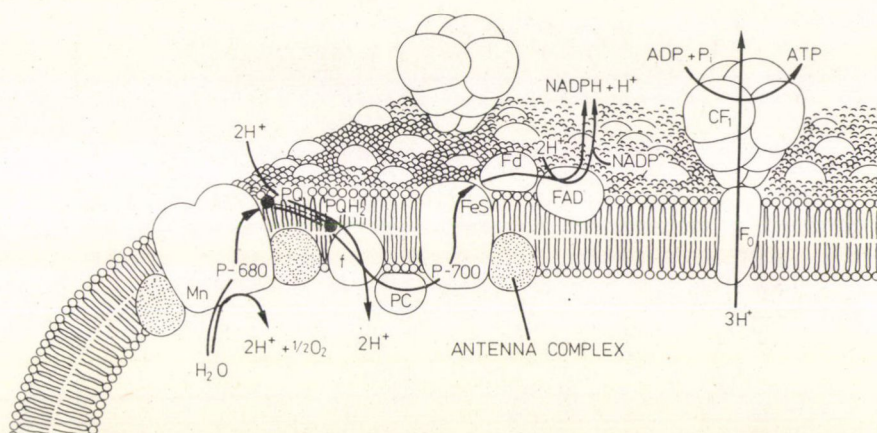
A fotoszintézis — mint ismeretes — algákban, baktériumokban és magasabb rendű növényekben a napfény fotonjaiban lévő energiát felhasználva termel szerves anyagokat. Közbenső lépésként — a sejtek fenntartásához és a szerves anyagok termeléséhez szükséges — nagy energiatartalmú — ATP molekulák szintetizálódnak.

Az oxidatív foszforiláció az aerob élőlényekben valósul meg. Különböző táplálék molekulák energiáját alakítják át a résztvevő membránrendszerek ATP molekulák energiájává. Magasabbrendű élőlényekben ez a szerkezet a mitokondriumban helyezkedik el.

Nagyon fontos eredménynek kell tartanunk azt a tényt, hogy az utóbbi két évtizedben megismertük, hogy a két különböző rendszer elvben azonos módon alakítja át a rendelkezésre álló energiát ATP molekulák energiájává.

2a) Fotoszintetikus membránrendszerek

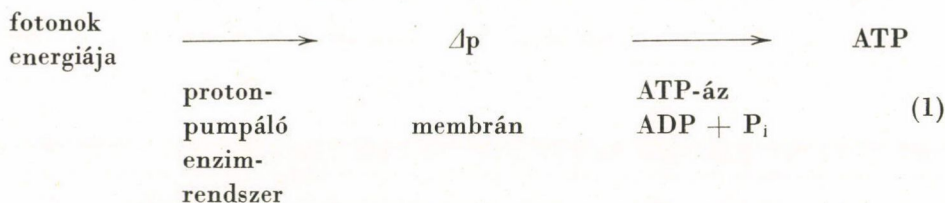
A 2. ábrán látható a fotoszintetizáló membrán (tilakoid) vázlata. Hosszú és fáradtságos munka alapján alakult ki ez a modell a membrán szerkezetére. Sikerült a működés egyes elemeit a szerkezetet alkotó molekulákhoz hozzárendelni. A fényt a membránba rendezett módon beépülő klorofill molekulák abszorbeálják, és az elnyelt energiát nagyon gyorsan (10^{-10} s) továbbítják az ún. reakció centrumokhoz [38]. A magasabbrendű fotoszintetizáló rendszerekben két reakció centrum van: PSI és PSII. A PSII rendszerhez eljutó foton energiája valószínűleg egy speciális kapcsolatban (pl. fehérjével) levő klorofill



2. ábra. A fotoszintézisben döntő szerepet játszó tilakoid membrán egy részének vázlata. A membrán váza a lipid kettős réteg. A PSI centrum abszorpciós sávja 700 nm-nél van. P-700 a jelzése, a PSII centrumnál P-680. Mindkét centrum mellett megtalálható a klorofill molekulákat magába foglaló antenna komplex. A P-680-as reakciócentrumba továbbított foton energiája egyrészt bontja a vizet és egy elektront küld az elektron továbbító láncon (redox láncon, amelynek tagjai a PQ plasztokinton, f citokrom és PC plasztocianin molekulák) a P-700-as centrumban. E közben a felszabaduló energia kívülről proton pumpát a tilakoid belsejébe. Az elektron redukálja a függetlenül abszorbeált második foton hatására oxidált P-700-as centrumot. Az elektron továbbhalad a FeS—Fd—FAD fehérjéből álló redox láncon és a NADP⁺ molekulákat redukálja protonokkal együtt NADPH + H⁺ energiadús molekulákká. Az átpumpált protonok az ATP-áz molekulán (F₀, F₁ részek) visszajutva ATP-t szintetizálnak

molekula elektronját gerjesztett állapotba emeli. Az elektront további molekulák (plasztokinton és citokrom típusú fehérjék) sorban egymás után átveszik [15]. Az egyes lépések energiacsökkenéssel járnak. A rendszer a felszabaduló energia ellenében protonokat pumpál a tilakoid membrán belsejébe, amelynek hatására a membránon elektromos feszültség lép fel és a belső tartomány pH-ja lecsökken. Az elektromos feszültség és a pH különbség energiatároló, amelyből a rendszer az ATP — szintetizálásához szükséges energiát meríti. A tilakoid membránban helyezkednek el az ATP-áz molekulák, amelyek az ATP molekulákat ADP + P_i-ből szintetizálják. Ehhez az endoterm reak-

cióhoz az ATP-áz az energiát az átpumpált protonok visszaáramlása során gyűjti össze. A fotoszintetikus rendszerekben bekövetkező ATP-szintézis (fotoszintetikus foszforiláció) általános képe:



Itt a fenti sémát 1961-ben megjósoló MITCHELLT [28] követve a

$$\Delta p = \Delta \Psi - \Delta pH \quad (2)$$

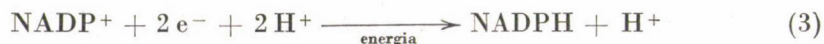
jelölést használtuk, ahol Δp jelöli a protonmotoros erőt (ez MITCHELL szóhasználatára, a helyes elnevezés az átpumpált protonok elektrokémiai potenciálja), amely a membránon kialakuló $\Delta \Psi$ potenciál-különbség és ΔpH H^+ ionkoncentráció különbség összege.

Továbbhaladásunk szempontjából az ATP képzés fenti modellje a lényeges, ennek ellenére néhány szóval teljesebbé tesszük a fotoszintézis ismertetését. A PSII rendszer további funkciója a vízbontás. 4 foton abszorbeált energiájából egy eléggé ismeretlen enzimrendszer összegyűjt annyi energiát, amely 2 H_2O molekula elbontásához elegendő



séma szerint.

Az elektron visszajut a reakciócentrumba és azt redukálja (pótolja a redox láncon elcsorgott elektront). Az O_2 kiszabadul, a 4 H^+ ion egyelőre sorsára vár. Közben a PSI rendszer is abszorbeál egy fotont, a gerjesztett állapotban az elektront további redox enzimek elvonják. A PSI rendszert a PSII-ből érkező elektron redukálja. A PSI-rendszerből származó elektron eljut a NADP redukáz enzimhez, amely egy $NADP^+$ molekulához elektront és protonokat köt a

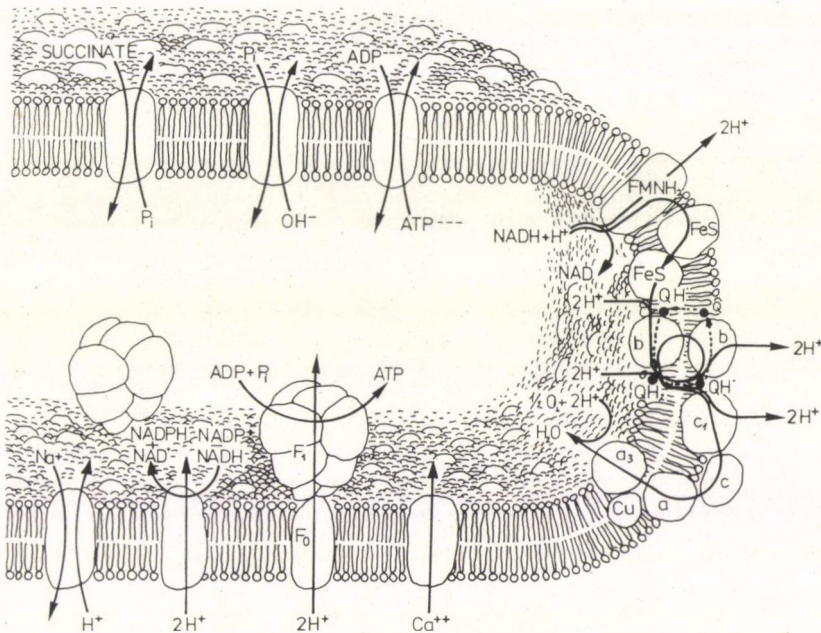


séma szerint. Itt használja fel a fotoszintetizáló rendszer a vízbontásból származó H^+ ionokat. Végző mérlegként 8 foton abszorpciójából (4 a PSII-ben és 4 a PSI-ben) 2 db $NADPH + H^+$ csoportot kapunk, amelyeket a korábban szintetizált ATP molekulával együtt (~ 1 molekula/1 foton a PSII rendszer-

ben) a Calvin-ciklus használja fel a cukor molekulák szintetizálására CO_2 és H_2O -ból.

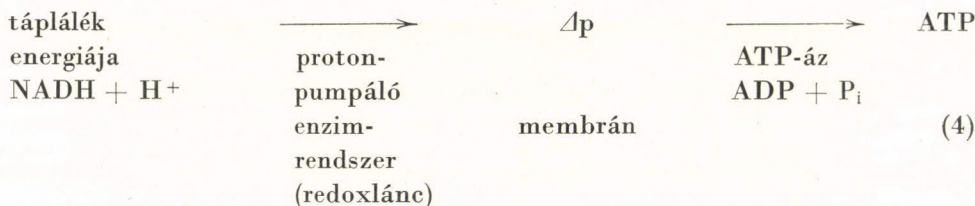
2b) Oxidatív foszforiláció

A 3. ábrán feltüntettük az oxidatív foszforiláció színhelyének, a mitokondriális belső membrán szerkezetének sémáját. A táplálék molekulákat (pl. cukrot) a mitokondrium belsejében a Szentgyörgyi—Krebs-ciklus enzimeji dolgozzák fel. Eredményül a NAD^+ molekulákat redukálják és $\text{NADH} + \text{H}^+$ formában H_2 molekulát kötnek, amelyet a membránban lévő enzimszisztéma dolgoz fel. A $\text{NADH} + \text{H}^+$ csoport kölcsönhatásba lép a redox lánc első tagjával (3. ábra) olyan módon, hogy 2H^+ ion felszabadul és két elektron a redox láncban — bizonyos szakaszokon egyenként — végighalad, a legvégső enzimkomplexe (citokrom C oxidáz) 2e^- , 2H^+ és $\frac{1}{2}$ molekula O_2 egy H_2O molekulává egyesül. A redox lánc közvetítésével valójában egy H_2 molekula ég el, oxidálódik vízzé. A körben — az enzimplánc közvetítésével — apró lépésekben fel-



3. ábra. A mitokondriális belső membrán egy részének vázlata. A táplálék energiája a Szentgyörgyi—Krebs ciklusból $\text{NADH} + \text{H}^+$ energiadús molekulák formájában csatolódik ki. Itt tulajdonképpen egy H_2 molekula kötődik NAD^+ molekulához. A H_2 molekula $2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$ formába jut kölcsönhatásba a membránba beépült fehérjékkel, és végeredményképpen oxigénnel vízzé ég el. A fehérjék redox láncot képeznek, az elektronok áthaladása során protonot pumpálnak a külső térbe a belső térből. FMN-flavoprotein, FeS vasszulfid fehérjék (ferredoxinok), b, c₁, c, a, a₃, citokrom fehérjék (a citokrom aa₃ komplex Cu-t is tartalmaz). Az átpumpált protonok az ATP-áz molekulán (F₀, F₁) visszajutva ATP-t szintetizálnak. A membránban további szerkezetek vannak, amelyek anyagok szállítására, cseréjére szolgálnak

szabaduló energia ismét protonokat pumpál — jelen esetben a belső térből kifelé — amely a membránon létrehozza az (1) egyenletnek megfelelő protonmotoros erőt, amely membrán potenciál és pH grádiens formájában jelenik meg. Az oxidáció eredménye tehát a Δp protonmotoros erő. A foszforiláció, az ATP szintézis, a membránban lévő ATP-áz molekulákon valósul meg (ezek a belső oldalon helyezkednek el). Az oxidatív foszforiláció általános képe (3)-hoz hasonló:



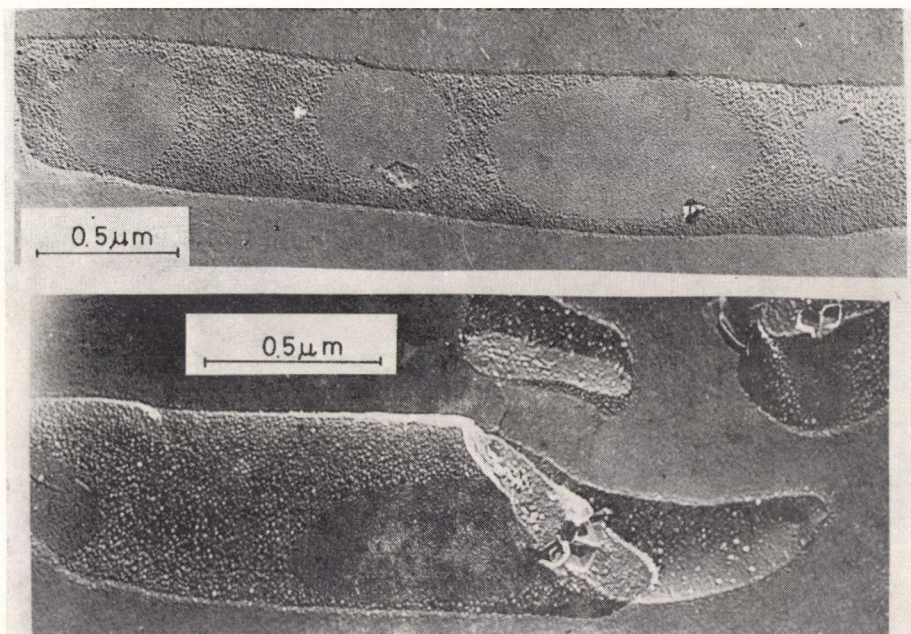
Az (1) és (4) séma csaknem teljes mértékben hasonló. Az ATP szintézisnél az energia akár fény, akár táplálék formájában kerül a rendszerbe, protonmotoros erő keletkezik, amely protonokat pumpál a membránon keresztül. Az energia membrán potenciál és pH különbség formájában áll az ATP-áz molekulák rendelkezésére. Az oxidatív folyamatokat a membránrendszer csatolja a foszforilációs folyamatokhoz.

Az energia átalakítás fent vázolt képe ma már általánosan elfogadott [3], elnevezése Mitchell-féle kemiozmotikus hipotézis. Kemiozmosis ebben az elnevezésben azt jelenti, hogy kémiai energiák hatására a membránon keresztül irányított, vektoriális mozgás jön létre, a vektoriálisan mozgó részecske a proton. A Mitchell-féle elmélet nagyon keveset mond a proton pumpa molekuláris mechanizmusáról.

(Itt jegyezzük meg, hogy az élőszervezetekben jónéhány más pumpa, pl. Na-pumpa, Ca-pumpa stb. is működik, amelyek rendkívül fontos életjelenségekhez kapcsolódnak. Ezek molekuláris mechanizmusa sem ismeretes).

2c) *Halobacterium halobium*

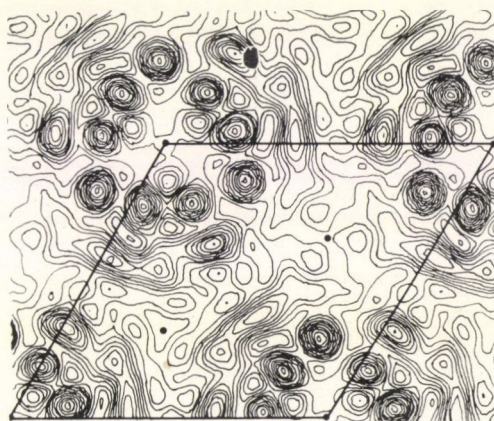
A 70-es évek elején egy a fentiektől különböző energiaátalakító rendszert fedeztek fel [29]. A *Halobacterium halobium* erősen sós vizekben szaporodik. Sejtfalában fényérzékeny anyagok, ún. bakteriorodopszin (BR) molekulák találhatók, amelyek nagyon hasonlítanak a látásért felelős rodopszin molekulákhoz. Kb. 26 000 dalton molekulasúlyú fehérjéhez fényérzékeny molekula, a retinál csatlakozik. Nagyon fontos tény, hogy a BR molekulák ~ 500 nm átmérőjű membrán szigetben, ún. bíbormembránban helyezkednek el, amelyből több (4–10) is van a baktérium felületén (méretek $6 \mu\text{m}$ hosszúság, $1 \mu\text{m}$ átmérő 4. ábra). A bíbormembránok a lipiden kívül csak BR molekulákat tartalmaznak, amelyek szigorú, kvázikristályos rendben helyezkednek el (5.



4. ábra. A *Halobacterium halobium* sejt elektronmikroszkópos képe. Jól látható a $\sim 0.5 \mu\text{m}$ átmérőjű bakteriorodopszint tartalmazó membrán darab. (V. A. BOROVJAGIN (Puscsino) felvétele)

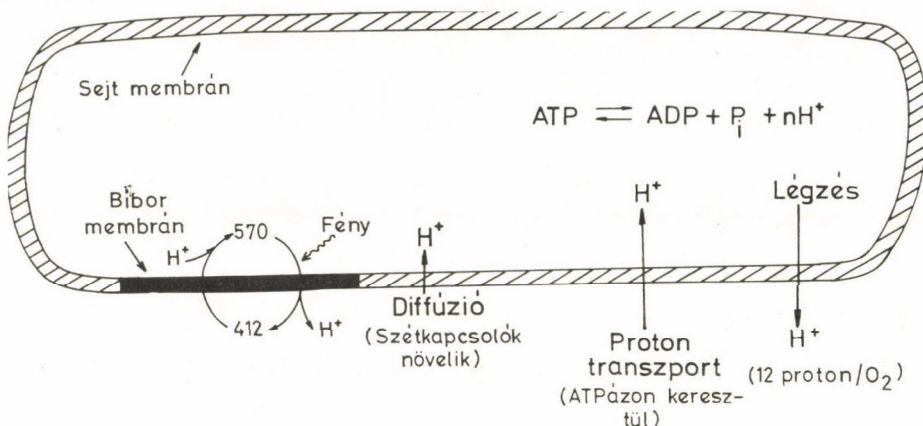
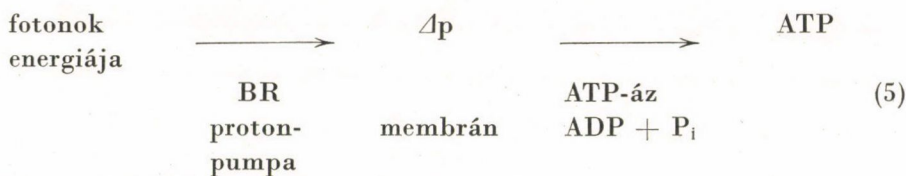
ábra) [35]. A baktérium teljes membránján a bíbormembrán szigeteken kívül még sok más funkcionális egység is van (6. ábra), amelyek közül számunkra az ATP-áz molekula a fontos.

A kísérleti vizsgálatok szerint a BR molekulák az abszorbeált fotonok hatására (az abszorpciós sáv maximuma $\lambda = 570 \text{ nm}$) protonokat pumpálnak



5. ábra. Elektronmikroszkópos felvételtől rekonstruált sűrűség eloszlás a bíbormembránban. A BR molekulák egyenként hét hélixből állnak, amelyek átszelik a membránt. Egy-egy szabályosan 6.1 nm -re elhelyezkedő rácpont körül 3 BR molekula helyezkedik el

a sejt belsejéből a külső térbe, Δp protonmotoros erő keletkezik, amely a protonokat az ATP-ázon keresztül visszaáramoltatva ATP-szintézist eredményez. A foszforilálás vázlata:



6. ábra. A *Halobacterium halobium* sejt membránjának a vázlata

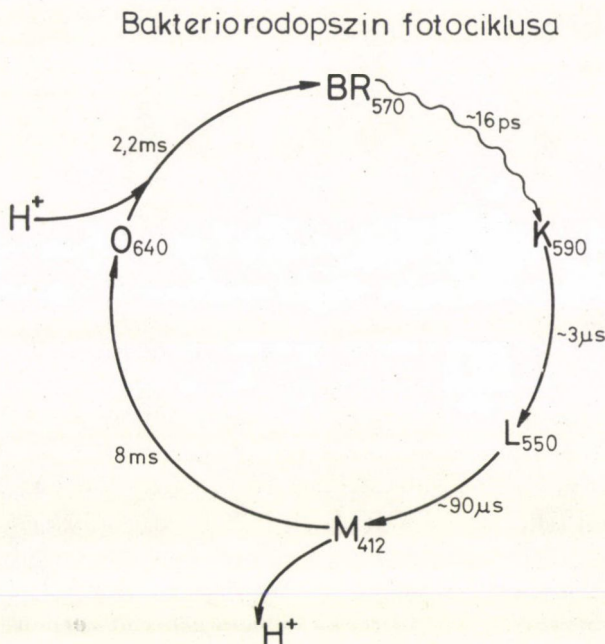
A (1), (4) és (5) séma hasonlósága szembevetendő. Eltérés csak a protonpumpálás módjában van. A (1) és (4) sémákban a protonpumpa bonyolult, biztosan több molekula vesz részt a folyamatban, az (5) sémánál azonban egyetlenegy molekula, a BR molekula végzi a protonpumpálást. Világosnak látszik, hogy a protonpumpa molekuláris mechanizmusának tanulmányozását a bíbormembrán rendszeren kezdjük meg.

3. A bakteriorodopszin fotociklusa

A bíbormembrán szigeteket a sejtekből biokémiai módszerekkel izolálni lehet, a BR molekulák eközben megtartják funkcionális tulajdonságaikat. Mód nyílik tehát egy nagyon egyszerű membrán rendszer — lipid és egyetlen típusú fehérje — működésének in vitro vizsgálatára.

A kapott eredményekből kiemeljük a BR fotociklusára vonatkozó ismereteket. A BR molekulák egy foton abszorpciója után (max = 570 nm) kb. 15 ps alatt egy új állapotba kerülnek, amelynek az abszorpciós maximuma

$\lambda = 590$ nm-nél van [1]. Ez a K állapot. Innen termikus gerjesztési cikluson haladva jutnak vissza az alapállapotba. A $K \rightarrow L \rightarrow M \rightarrow (N) \rightarrow O \rightarrow BR$ sorozatnál az élettartamuk és az új abszorpciós sáv maximális hullámhosszai a 7. ábrán találhatók. Megjegyezzük, hogy az N állapot léte vitatott [35], mi a következőkben e nélkül tárgyaljuk a fotociklust. A proton az $M \rightarrow O$ átmenet során lép ki a membrán külső oldalán és a rendszer a belső oldalról az $O \rightarrow BR$ átmenetben veszi fel a hiányzó protont, így áll helyre a molekula alapállapota.

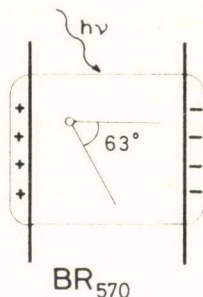


7. ábra. A bakteriorodopszin molekula fotociklusa. Az alapállapotban (BR_{570}) fény hatására ~ 15 ps idő alatt a K_{590} -es állapotba jutnak a molekulák, ahonnan a továbbiakban termikusan gerjesztett átmenetek során a L_{550} , M_{412} , O_{640} állapotokon keresztül visszakerülnek az alapállapotba. Az időállandók szobahőmérsékletre vonatkoznak. A protonok az $M_{412} \rightarrow O_{640}$ átmenet során lépnek ki és az $O_{640} \rightarrow BR_{570}$ átmenetben lépnek be a fehérjékbe

Lézer—Raman-spektroszkópiai vizsgálatokkal bebizonyították, hogy a retinál a fehérje egy lizin aminosavjához kötődik Schiff-bázissal. A Schiff-bázison egy kompenzálatlan proton van alapállapotban. Ez a proton lép ki — valahogy — a fotonok hatására a külső oldalra és erre a helyre lép be egy másik proton belülről. Az is ismeretes, hogy a Schiff-bázis a fehérjékben a belső oldalhoz közelebb van, és a retinál innen kiindulva mintegy 63° -os szöget zár be a membrán normálisával (8. ábra).

A vizsgálatokat élő baktériumokon is elvégezték [35], amelyekből tudjuk, hogy a protonpumpa a fent vázolt ciklus szerint működik in vivo is.

A protonpumpa molekuláris mechanizmusának jobb megértése céljából új módszert vezettünk be a bíbormembránok orientálására [22], majd felismertük, hogy a proton-pumpa működése közben elektromos jel indukálódik, amely a BR fotociklusához társult [23].



8. ábra. A BR molekula elhelyezkedése a membránban. A retinál $\approx 63^\circ$ -os szöget zár be a membrán normálisával

4. A bíbormembránok orientálása

Jólismert jelenség az, hogy makromolekulák (fehérjék, DNS, ...) vizes oldatban elektromos térben orientálhatók [11]. Nagyobb sejtrészecskéket — pl. kloroplasztiszokat — kezdetben mágneses térrel [13], később váltakozó elektromos térrel (50 Hz) orientáltak [12]. A bíbormembránok orientálásáról is volt irodalmi utalás: nagyfeszültségű impulzusokkal sikerült nagyon rövid időre orientálni bíbormembránokat vizes szuszpenzióban [32] és kb. 100 V/cm erősségű sztatikus elektromos térrel különleges gél rendszerben [9].

Részletes vizsgálataink során kiderült, hogy kb. 20 V/cm tér elegendő arra, hogy a bíbormembránokat praktikus szempontból 100%-osan orientáljuk.

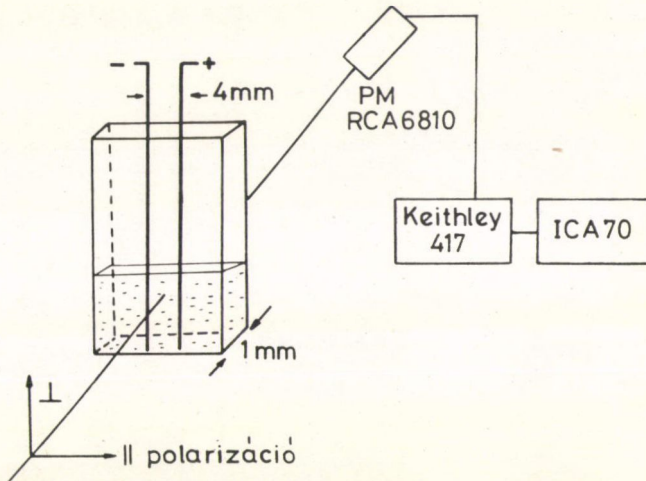
A mérő rendszer vázlatát a 9. ábrán mutatjuk be. Az 1 mm vastag küvetában bíbormembrán szuszpenziót öntöttünk. A Pt elektródák 4 mm távolságban voltak, a 4–5 mm magas oszlop ellenállása $\approx 2 \cdot 10^4 \Omega$, az oldat optikai sűrűsége 1,8 volt.

Részecskék orientálásának mérésére a lineáris dikroizmus jelensége használható [11]: az orientált mintán áthaladó lineárisan polarizált fény abszorpciója (A) megváltozik (ΔA) a következő egyenletek szerint:

$$\frac{\Delta A_{\perp}}{A} = -\frac{1}{A} \log \left(1 + \frac{I_{\perp}}{I} \right) = \Phi(E) \left(\frac{3}{2} \sin^2 \theta - 1 \right) \quad (6a)$$

$$\frac{\Delta A_{\parallel}}{A} = -\frac{1}{A} \log \left(1 + \frac{I_{\parallel}}{I} \right) = \Phi(E) (3 \cos^2 \theta - 1) \quad (6b)$$

ahol $\perp$ és $\parallel$ jelenti az eredményeket abban az esetben, ha a fény polarizációs síkja merőleges, illetve párhuzamos az orientáló elektromos tér irányával. I_0 fényből a mintán I fény jut keresztül $\left(A = \log \frac{I_0}{I}\right)$, $I_{\perp}$ és $I_{\parallel}$ a mért fényintenzitás változás az orientálás hatására. $\Phi(E)$ az E elektromos térerősségtől függő orientációs függvény. Telítésnél $\Phi(E) \rightarrow 1$. A molekulában lévő fényabszorbeáló egység, a retinál átmeneti momentum vektora és a térerősség iránya



9. ábra. MÉRŐRENDSZER az orientálás tanulmányozására

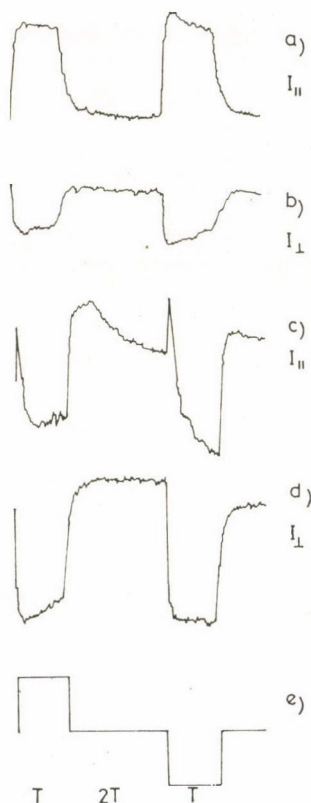
közötti szög Θ . Minthogy azt várjuk, hogy a membrándarabok, mint 500 nm átmérőjű és kb. 5 nm vastagságú korongok az elektromos tér irányára merőlegesen állnak be (a korongok normálisa párhuzamos az elektromos tér irányával), Θ az átmeneti momentum vektor és a normális közötti szög (lásd 8. ábra). Az elektromos tér iránya körül hengerszimmetria van, tehát a vektorok egy Θ nyílásszögű kúpon foglalnak helyet. Előző vizsgálatokból ismeretes volt, hogy $\Theta \simeq 60-70^\circ$ [17, 24], ezért $\frac{\Delta A_{\perp}}{A} > 0$, $\frac{\Delta A_{\parallel}}{A} < 0$ értéket várunk, amelyből 6a, b egyenletek alapján következik, hogy $I_{\perp} < I_{\parallel} > 0$. 6a és 6b egyenletekből az is következik, hogy

$$\frac{\Delta A_{\perp}}{A} = -\frac{1}{2} \frac{\Delta A_{\parallel}}{A} \quad (7)$$

Θ -tól és $\Phi(E)$ -től függetlenül.

A fényintenzitás változásokat az elektromos térerősség függvényében mértük $\lambda = 562$ nm-nél. Minthogy a bíbormembránok elektromos térben elektroforetikus mozgást is végeznek, a 10e. ábrán látható módon T ideig pozitív, 2T ideig nulla, majd T ideig negatív térerősséget alkalmaztunk, T

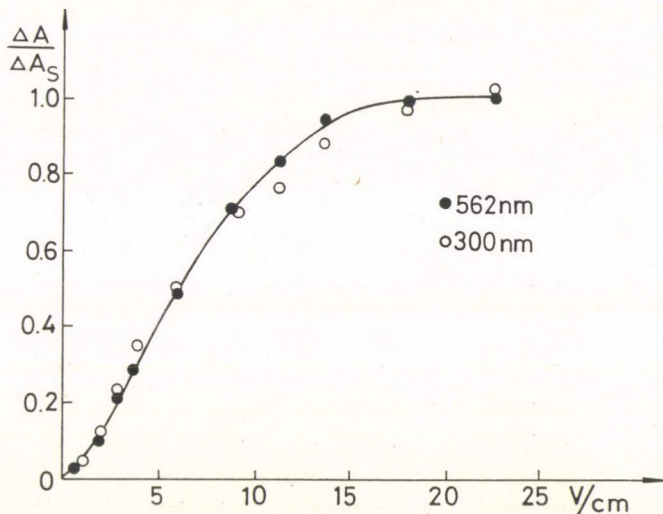
általában 3 s volt. A (7) egyenlet ≈ 4 V/cm térerősségnél teljesült (10a, b ábra), de magasabb térerősségnél (18 V/cm, 10c, d ábra) $I_{||}$ kezdeti pozitív tartományból gyorsan átesapott negatív tartományba, $I_{\perp}$ viselkedése „normális” volt, vagyis $\frac{\Delta A_{\perp}}{A}$ a térerősség növekedésével telítést mutatott (11. ábra). Az $I_{||}$ anomáliát azzal magyarázzuk, hogy az elektroforetikus mozgás



10. ábra. A fényintenzitás változások időfüggése abszorbeáló bábormembránok esetén. $\lambda = 562$ nm. (a) az elektromos tér irányával párhuzamosan polarizált fény ($I_{||}$), térerősség $E = 4$ V/cm; (b) merőlegesen polarizált fény ($I_{\perp}$), $E = 4$ V/cm; (c) $I_{||}$, $E = 18$ V/cm; (d) $I_{\perp}$, $E = 18$ V/cm; (e) az alkalmazott térerősség időfüggése $T = 3$ s

során a bábormembrán korongok elfordulnak [22]. A magyarázatot további vizsgálatokkal megerősítettük, amikor az orientálást pH függvényében mértük [7]. Ismeretes, hogy a bábormembránok töltését pH-csökkenéssel kompenzálni lehet, ennek következtében csökken az elektroforézis sebessége, tehát a fellépő elfordulásnak is csökkenie kell. A mérések szerint kisebb pH-nál a görbék jobban megközelítették a 7. egyenlet követelményeit.

A mérési adatok analiziséből sok értékes információt nyerhetünk. A tér kikapcsolása után az orientáció a részecskék rotációs diffúziója következtében összeomlik. A mérésekben két időállandót is találtunk $\tau_1 = 250$ ms, és $\tau_2 = 1,7$ s (az elektroforézis miatt bekövetkező elfordulás időállandója $\tau_3 \simeq 420$ ms volt). A két időállandó különböző méretű részecskékre vall. Mint-hogy a rotációs diffúzió miatt bekövetkező relaxáció időállandója $\tau \simeq r^3$, ahol r a részecske sugara, τ_2 időállandójú részecske sugara $r_2 = \sqrt[3]{\tau_2/\tau_1} \cdot r_1 \simeq 2r_1$.



11. ábra. $\Delta A/A$ mennyiség függése az elektromos térerősségtől. Az adatokat a telítési értékre $(\Delta A/A)_s$ normáltuk. $\lambda = 562$ nm és 300 nm

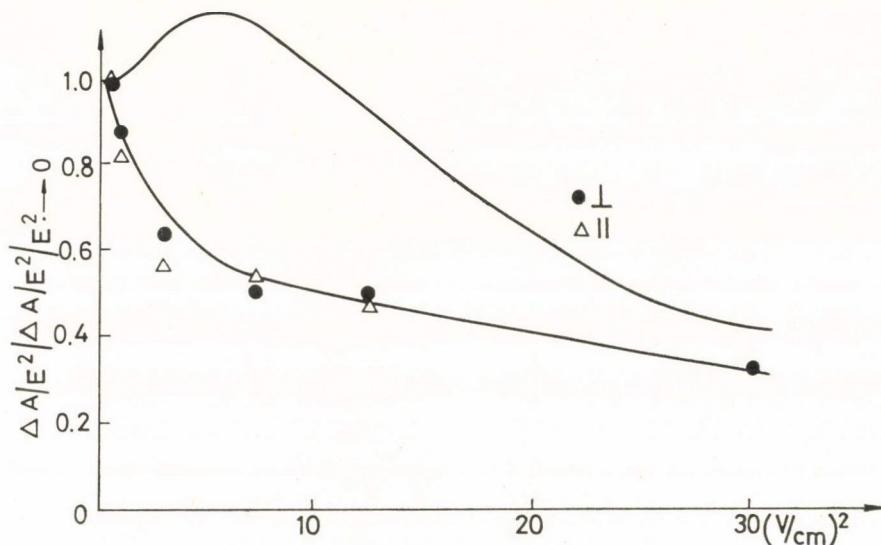
A nagyobb részecskék intenzitása kb. $\simeq 15\%$. A további analizisnél a nagyobb részecskék hatását elhanyagoljuk.

A következő fontos ismeretet a 11. ábrán közölt telítési görbe alapján nyerhetjük. Telítésnél $\Phi(E) \simeq 1$, tehát $\frac{\Delta A_{\perp}}{A} = 0,11 \pm 0,02$ értékből $\Theta = 59 \pm 1^\circ$ számítható ki a 6a egyenlet alapján. Az orientáció az adott rendszerben elektromos dipólmomentum alapján valósul meg, azt mondhatjuk, hogy a dipólmomentum és az átmeneti momentum vektor közötti szög 59° méréseink alapján. Az újabb vizsgálatokban sikerült $\Theta = 63^\circ$ -ot is mérni [7]. Állíthatjuk tehát, hogy Θ jó közelítéssel egyezik az egyéb módon (főleg szedimentálás utáni szárítással) előállított rétegek esetén mért szöggel [17, 24], amely azt mutatja, hogy az orientálásban résztvevő dipólmomentum nagyon jó közelítéssel párhuzamos a bíbormembrán normálisával.

Megjegyezzük, hogy az elektromos úton létrehozott irányítás valódi orientálás (azaz minden membránnak azonos oldala, jelen esetben a belső

oldala fordul a pozitív elektróda felé) míg szedimentálással, vagy mágneses térrel csupán párhuzamosítani lehet (alignement) a membránfragmentumokat.

Részecskék elektromos térben akkor orientálhatók, ha vagy permanens, vagy a térrel indukálható elektromos dipólnyomatékkal rendelkeznek. A telítési görbe megfelelő analiziséből eldönthettük, hogy a bíbormembránok permanens dipólnyomaték révén orientálódnak. A 12. ábrán a $(\Delta A/E^2)/(\Delta A/E^2)_{E^2 \rightarrow 0}$



12. ábra. A $(\Delta A/E^2)/(\Delta A/E^2)_{E^2 \rightarrow 0}$ mennyiség ábrázolása. A mérési pontokon áthaladó elméleti görbe a permanens, a másik az indukált dipólmomentumokat írja le

$(\Delta A/E^2)_{E^2 \rightarrow 0}$ mennyiséget ábráztuk E^2 függvényében. A mérési pontokon áthúzott görbe a permanens, a másik az indukált dipólmomentumok esetére vonatkozó elméleti görbe [11].

Permanens dipólnyomatékok esetén az orientációs függvény

$$\Phi(E) = \Phi(\beta) = 1 - 3 (\coth \beta - 1/\beta)/\beta \quad (8)$$

ahol $\beta = \mu BE/kT$, μ a részecske dipólnyomatéka, $B = E_{\text{int}}/E$ egy belső tér függvény, amely azt fejezi ki, hogy a belső tér a dipólnyomaték helyén különbözik az alkalmazott E tértől, k a Boltzmann állandó, T a hőmérséklet K fokban. A 11. ábra adataiból $\mu B = (6 + 1) \cdot 10^{-23}$ Cm számítható ki. Ezt az óriás dipólnyomatékokat a bíbormembránon lévő individuális dipólnyomatékok

összegeként foghatjuk fel. Tegyük fel, hogy az egyes dipólnyomatékok a BR molekulák és $B = 1$, akkor mivel egy 500 nm átmérőjű bíbormembránban mintegy $1,8 \cdot 10^4$ BR molekula van.

$$\frac{\mu_{BR}}{e} = n_e d = 18 \text{ nm},$$

ahol e az elemi töltés, n_e azok száma d távolságban. Ha $d = 4,5$ nm (a membrán vastagsága, a fehérje két oldalának távolsága), akkor $n_e = 4$. Ez a számítás természetesen közelítés, de érzékelteti, hogy a BR molekulát úgy foghatjuk fel, hogy a belső, illetve külső oldalon membránból kiérő részén pozitív, illetve negatív töltések vannak, és ezek alkotják a permanens dipólnyomatékot. A fenti kísérletekből nem dönthető el, hogy a negatív oldal a belső oldal, ezt a következő részben tárgyalt vizsgálatok alapján állítjuk. Természetesen további kísérletekkel kell azt a feltevést is igazolni, hogy a dipólnyomatékok a fehérjék sajátjai és nem esetleg a lipidek töltései okozzák.

5. A bakteriorodopszin fotociklusához társult elektromos jel

A bíbormembránok a fenti kísérletekben kellően hosszú ideig ($\approx 3-4$ s) vannak orientált állapotban ahhoz, hogy további kísérleteket lehessen rajtuk végezni. A rendszer ebben a „kvázistacionér” orientálási állapotban felfogható mint egy óriás membrán, amelyben a szokásosnál lényegesen több BR molekula van. Ezért várható volt, hogy a viszonylag nagy mennyiségű anyagon tiszta kísérleteket, kvantitatív értékelésre alkalmas méréseket végezhetünk.

Vizsgálataink megkezdése előtt gyors, bifázisos elektromos jelet figyeltek meg két nem túl jól definiált, többé-kevésbé orientált BR rendszeren [37, 19, 8].

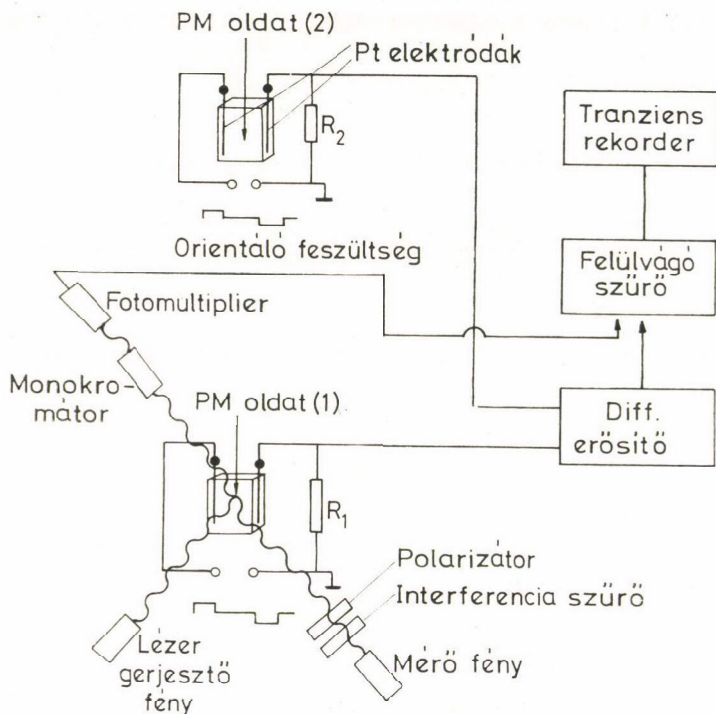
A jel rövid fényimpulzus hatására jelent meg. A vizsgálatokat a szerzők nem tudták kvantitatívvá tenni a BR rendszer indefinit volta miatt és nem sikerült kapcsolatot találni az elektromos jelek és a BR fotociklus között.

Az elektromos jelek tanulmányozására a 13. ábrán látható mérőrendszert állítottuk össze. Egy házilag készített kapcsoló egység (az ábrán nem látható) két feladatot látott el:

- i) Előállította az orientáláshoz szükséges, T , $2T$, T időkkal rendelkező pozitív — nulla — negatív négyszöget jelet ($T \approx 3$ s);
- ii) Az első két időintervallumban (T , $2T$) tetszőleges időben indító jelet adott egy Opton festék lézerre, amely $\lambda = 580$ nm, $1 \mu\text{s}$ hosszú és 10 mJ energiájú fényimpulzust adott. Ugyanakkor indította a tranziens rekordert (KFKI, legkisebb konverziós idő $0,1 \mu\text{s}$, konver-

ziós tartomány 256 egység/csatorna, 1024 csatorna mérési tartomány).

A két identikus bíbormembrán rendszert használtuk az elektromos mérésekhez, mert az R_1 munkaellenálláson elkerülhetetlenül megjelenő orientáló feszültségből származó jelet, amely rendszerint nagyobb volt, mint a mérendő jel, kompenzálnunk kellett. A Keithley 604 differenciális erősítő mindkét rend-

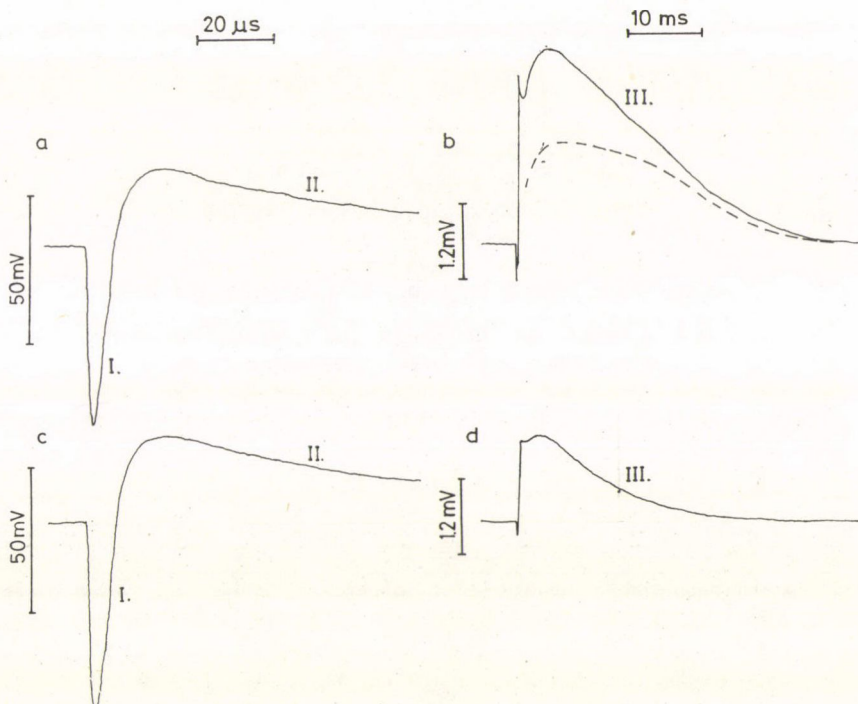


13. ábra. Az elektromos jelek tanulmányozására szolgáló mérőrendszer vázlata

szerből azonos nagyságú és alakú orientálásból származó jelet kapott, amelyre a kimeneten nem adott jelet. Az R_1 ellenálláson a lézer impulzus hatására is jelent meg jel, ezt az erősítő természetesen erősítette, és az a felülvágó szűrőn keresztül bejutott a tranziens rekorderbe. Az egész rendszer idő felbontása $1,5-2 \mu s$ volt (a felülvágó szűrő határfrekvenciája $0,5 Mc$). A határfrekvenciát csökkentettük, amikor hosszabb időállandókat mértünk.

A mérőrendszerhez egy fénymérő út is tartozott, amely kettős célt szolgált: egyrészt ellenőriztük a lineáris dikroizmus méréssel az orientáció bekövetkeztét, másrészt a fotociklust követtük különböző hullámhosszú fénnyalábbal végezve méréseket. A fénymérő fotomultiplier jele a differenciális erősítő után csatlakozott a rendszerbe.

A 14. ábrán bemutatjuk az orientált membránrendszeren mért elektromos jeleket, amelyeket a lézer impulzus gerjesztett. A jeleket $t = 2,5$ s és $t = 3,3$ s időben, tehát elektromos tér jelenlétében és anélkül is mértük. Látható, hogy a két gyors komponens praktikusán azonos, míg a lassú komponensben különbség van, amelyet a *b* ábrán a szaggatott görbe mutat. Elektromos



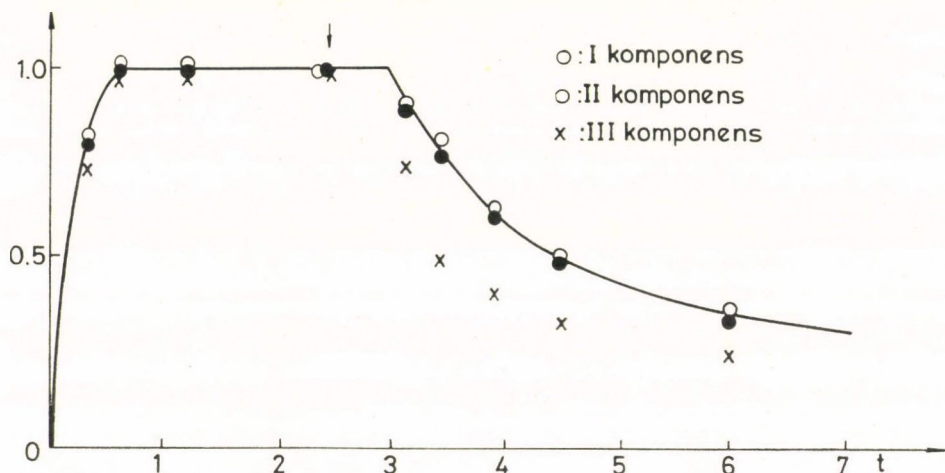
14. ábra. Az elektromos jelek időfüggése: (a, b) $t = 2,5$ s (tér és orientáció van) esetén mért jelek; (c, d) $t = 3,3$ s (tér nincs, orientáció van). (b) ábrán a szaggatott vonal a (b) és (d) görbe különbsége (az utóbbit az I komponensre normáltuk). A bíbormembránok vizes szuszpenzióban voltak, $A = 1,8$, $T = 20$ °C, orientáló feszültség $8,5$ V. Az elektródák közti távolság $D = 0,8$ cm

tér nélkül nyilvánvalóan van még orientáció, amely csak bizonyos idő alatt relaxál. Ennek pontosabb tanulmányozása érdekében mértük az orientációval arányos lineáris dikroizmus jel idő függését (15. ábra folyamatos vonal) és erre normáltuk a különböző időkben kapott elektromos jelek amplitúdóit (I, II, III). (A mérésekben nagyobb bíbormembrán részecskék voltak, ezért nagyobb a relaxáció időállandója). Látható, hogy az I. és II. komponens kizárólag az orientálástól függ, a III. komponensben van elektromos tértől függő rész is.

Az elektromos tértől függő részt könnyen megérthetjük. A jelet a proton-pumpálás hatására tranziensen felszabaduló protonok okozzák. A membrán

egyik oldalán kilépő protonok megnövelik az oldatban a vezetőképességet annyi időre, amíg a másik oldalról be nem lép egy másik proton a kilépett helyére. A görbe (14b ábra, szaggatott görbe) alatti terület $2,56 \cdot 10^{-4} \text{Vs}$. Ennek értékelésére később térünk vissza.

Az elektromos jel orientáció és tér függésének megállapítása után ugyanazon a mintán parallel mértük az elektromos jelet és a fényabszorpciós jeleket különböző hullámhosszokon azzal a céllal, hogy az elektromos jele-



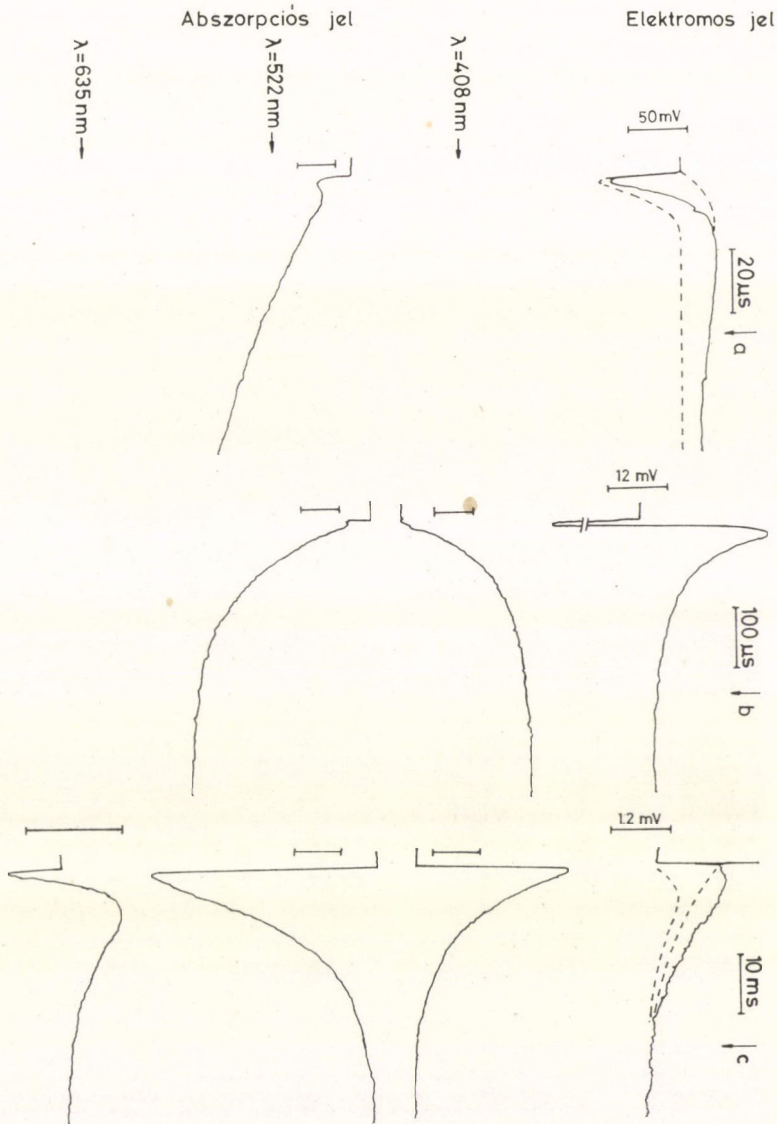
15. ábra. Az elektromos jel komponensei amplitúdójának korrelációja az orientációval. Az orientáció fokát $\lambda = 570 \text{ nm}$ -es polarizált fényrel mértük, ezt jelzi a kihúzott görbe. Az adatokat a nyíllal jelzett pontban normáltuk

ket a BR fotociklusának a lépéseivel hozzárendeljük. Az eredményeket a 16. ábrán gyűjtöttük össze. A hozzárendelést a jelek kvantitatív leírásával kezdjük.

Az I. komponens exponenciálisan eső negatív jel $\tau_1 \simeq 4 \mu\text{s}$ időállandóiban. Ugyanezt az időállandót lehet megfigyelni az A_{522} és A_{408} fényabszorpciós jelben. A_{522} mutatja a K-forma azonnali megjelenését és bomlását τ_1 időállandóval az L-formába (K $\rightarrow$ L átmenet). A_{408} megjelenése τ_1 idővel késik.

A II. komponens pozitív jel; $\tau_2 \simeq 80 \mu\text{s}$ időállandóval. Ez az L $\rightarrow$ M átmenet időállandója is, amelyet az A_{522} görbén mint az L_{550} forma eltűnését és az A_{408} -as görbén mint az M_{412} forma megjelenését lehet megfigyelni. A 16a ábra a gyors kétfázisú jel felbontását mutatja. Ezek szerint a pozitív jel tartalmaz τ_1 időállandójú emelkedő szakaszt, amely a szülő-leány bomlás összefüggéseit jelzi.

A III. hosszú életű komponens (amelyhez hasonló előttünk senki sem észlelt) viszonylag komplex jel. Ha a tranzien vezetőképesség növekedés



16. ábra. Az elektromos jelek és a fényabszorpciós jelek (különböző hullámhosszokon) összehasonlítása. (a–c) különböző időfelbontással mért jelek. Az elektromos jeleket $t = 3.3$ s időben mértük. Az (a) és (c) oszlopban található szaggatott vonalak az elektromos jelek dekompozícióját jelzik. Bibormembránok H_2O szuszpenziója, $A = 1.8$, $T = 20^\circ C$, orientáló feszültség 8.5 V. Az abszorpciós jeleknél a lépték minden esetben $\Delta I/I = 0.1$ értéket jelez. Pozitív jel esetén $\Delta I < 0$

okozta jeltől eltekintünk, akkor a visszamaradó jel (16c ábra) egy exponenciálisan eső pozitív jel ($\tau_3 \approx 8$ ms) és egy szülő-leány jel szuperpozíciója. Az $M \rightarrow O$ átmenet időállandója az A_{408} görbén $\tau_3 \approx 8$ ms. A szülő-leány jel az

$O \rightarrow BR$ átmenet időmenetével egyezik, amelyet az A_{635} görbe mutat. Az $O \rightarrow BR$ átmenet időállandója $\tau_4 \simeq 2$ ms.

1. táblázat

A fotociklus egymást követő átmeneteihez társuló elektromos és abszorpciós jelek időállandói. Az adatok H_2O szuszpenzióra és D_2O szuszpenzióra (zárójelben) vonatkoznak

Átmenet Jel típus	$K \rightarrow L$ τ_1 (μs)	$L \rightarrow M$ τ_2 (μs)	$M \rightarrow O$ τ_3 (ms)	$O \rightarrow BR$ τ_4 (ms)
Elektromos	4,4 (6.2)	81 (452)	8.0 (22.0)	2.5 (4.0)
A_{408}		81 (429)	7.9 (20.0)	
A_{522}	3.7 (5.1)	91 (445)	8.5 (20.0)	
A_{635}			9.2 (21.0)	2.2 (4.1)

A $\tau_1 - \tau_4$ időállandókat meghatároztuk a görbékéből és az 1. táblázatban összegyűjtöttük. A számításokban a szokásos szülő-unoka ... egyenleteket használtuk, amelyeket a rádióaktív bomlássorozatokból ismerünk (ezek az ún. Buteman-egyenletek [10]). Figyelembe vettük, hogy a komponenseknek a sorozatban különböző előjelük és amplitúdójuk lehet.

Az elektromos és abszorpciós jeleket megmértük és analizáltuk abban az esetben, amikor a bíbormembránokat a szokásos H_2O -oldatból centrifugálással lecsapattuk és aztán D_2O -ban szuszpenzáltuk. Ismeretes, hogy ilyenkor bizonyos lazábban kötött hidrogénatomok deutériumra cserélődnek a fehérjékben, amelynek hatására a fehérjék időállandói megváltoznak. A $H-D$ kicserélődéséhez idő kell, ezért megvizsgáltuk, hogy a D_2O -ban való szuszpendálás után mily mértékben változik az elektromos jel. A 3 perc – 5 óra intervallumban nem tapasztaltunk változást a jelek amplitúdójában. Az időállandókat ($\tau_1 - \tau_4$) szintén az 1. táblázatban gyűjtöttük össze (zárójelben).

Az abszorpciós és elektromos jelek időállandóinak kvalitatív (16. ábra) és kvantitatív (1. táblázat) egyezése alapján állítjuk, hogy az elektromos jelek megfelelő komponensei a fotociklusban ismeretes $K \rightarrow L$, $L \rightarrow M$, $M \rightarrow O$ és $O \rightarrow BR$ átmenetek elektromos megfelelői. Ez a megfeleltetés található az 1. táblázatban.

A bakteriorodopszin fotociklusa $\tau_0 \simeq 15$ ps élettartamú nagyon gyors átmenettel ($BR \rightarrow K$) indul; ennek az átmenetnek, továbbá a kérdéses $M \rightarrow N$ átmenetnek az elektromos analóg jelét nem látjuk az elektromos jelben.

6. Az elektromos jel értelmezése: protonok elmozdulása

A 3. részben kifejtettek szerint a fotonok hatására protonok haladnak át a membrán belső oldaláról a külső oldalra a bakteriorodopszin molekulán keresztül. A Lézer—Raman vizsgálatok alapján ismeretes, hogy a Schiff-bázis a BR állapotba protonált és az M állapotba deprotonált. Elfogadhatjuk tehát, hogy a Schiff-bázison lévő proton indul el kifelé és ide jön belülről egy másik proton. HESS és KUSCHMITZ [16], valamint saját eddig nem publikált vizsgálataink szerint ismeretes, hogy tirozin és triptofán oldalláncok abszorpciója megváltozik a BR fotociklusa alatt, azzal időben korrelálva. A tirozin abszorpciójáról biztonsággal állítható, hogy a) egy tirozin molekuláról hiányzó egyetlen protonnak felel meg és b) felfutása a $K \rightarrow L$ időállandónak, lecsengése az $M \rightarrow O \rightarrow BR$ időállandónak felel meg. A triptofán jel értelmezése nem ilyen mértékben tiszta, de nincs ellentmondásban azzal, hogy egy proton triptofánhoz való kötődésének felel meg. Időállandó felfutása az $L \rightarrow M$ átmenetnek, lecsengése $M \rightarrow O$ átmenetnek felel meg.

A D_2O -oldatban szuszpendált hibormembránok esetében az egyes időállandók 1,5–5-ször növekedtek meg a H_2O szuszpenzió esetén mért megfelelő időállandóhoz képest. Ez azt mutatja, hogy a protonok, illetve deutronok nem szabadon mozognak a BR-ben, hanem különböző kötött állapotok igénybevételével, amelyeknek időállandói a $H-D$ kicserélődés következtében külön-különképpen változtak meg. Egyszerű szabad mozgás esetén $H^+ - D^+$ csere

$$\sqrt{\frac{m_2}{m_1}} \simeq 1,4\text{-szeres faktort eredményezett volna.}$$

A protonok áthaladását, a protonpumpát ezek szerint úgy értelmezhetjük, hogy a protonok a Schiff-bázisról termikusan indukált átmenetekben jutnak egyik helyről a másikra, végül kilépnek és a másik oldalról ugyanilyen átmenettel áll helyre az alapállapot. Ezt a képet tovább élesíti és bizonyos vonatkozásban kvantitatívva teszi az elektromos jel értelmezése.

Az elektromos jel oka az, hogy töltések mozdulnak el a két elektróda között és abban áramot indukálnak. A Ramo—Shockley-tétel szerint [33]

$$i = \frac{Q}{D} v, \quad (9)$$

ahol Q a töltés, v a mozgás sebessége és D az elektródák egymástól való távolsága. A v sebességnek nincs értelme kvantum átmenetekben, ezért csak az indukált töltést határozhatjuk meg. A (9) egyenletet integrálva

$$Q_{\text{ind}} = \frac{Q}{D} \int_0^\infty v dt = \frac{Qd}{D}, \quad (10)$$

ahol d a töltés elmozdulása a kvantumátmenetben. Q_{ind} tölti a kör C kapacitását amely az RC időállandón keresztül sül ki (R a mérő ellenállás, lásd. 13. ábra). Az egyszerűség kedvéért vegyük az elektromos jel első komponensét, amely egy τ időállandójú exponenciális függvény. Az indukált töltések időbeli sűrűsége

$$\varrho(t) = k e^{-kt} \quad (11)$$

ahol $k = \frac{1}{\tau}$. Ha N töltés elmozdulásából kapjuk a jelet, akkor az R mérőellenálláson

$$V(t) = \frac{NQ_{\text{ind}}k}{C} \int_0^{\infty} e^{-kt'} e^{-\frac{t-t'}{RC}} dt' = \frac{NQ_{\text{ind}}kR}{1 - kRC} \left(e^{-kt} - e^{-\frac{t}{RC}} \right). \quad (12)$$

Ha $\frac{1}{RC} \gg k$, vagyis $RC \ll \tau$

$$V(t) = \frac{NQRd}{D} k e^{-kt} \quad (13)$$

és a különböző komponensekre felírva

$$V_i(t) = \frac{NQR}{D} d_i k_i f(k_1, \dots, k_i, t), \quad (14)$$

ahol $f(k_1, \dots, k_i, t)$ az i -edik komponensre vonatkozó Buteman-függvény. Méréseinkben az $\frac{1}{RC} \gg k$ követelmény az első komponens kivételével messze-mően teljesül, minthogy $RC \simeq 2 \mu\text{s}$. Az első komponensnél $\tau_1 = 3,7 \mu\text{s}$ következtében a (14) egyenlet helyett a (12) egyenletet kell használni.

A (14) egyenletből látszik, hogy $V_i(t)$ mért értékéből R , D , k_i és N ismeretében d_i értékek meghatározhatók, tehát meghatározható, hogy egyes kvantum ugrásokban mekkora a protonok elmozdulása. Ebben a célkitűzésben a legproblematisabb N -nek, a ciklusban résztvevő molekulák számának a meghatározása.

A szokásos módszer a molekuláris extinkciós együtthatókon alapul. Az M_{412} forma maximális koncentrációját tekintik a ciklusban résztvevő molekulák koncentrációjának [26]. Ha a BR molekulák koncentrációja alapállapotban c , a ciklusban nc , a rétegvastagság x , akkor írhatjuk

$$I_1 = I_0 10^{-\epsilon_{BR}cx} \quad (15)$$

$$I_2 = I_0 10^{-[\epsilon_{BR}(1-n) - \epsilon_M n]cx}, \quad (16)$$

ahonnan

$$\frac{I_2 - I_1}{I_1} = \frac{\Delta I}{I} = 10^{-(\epsilon_M - \epsilon_{BR})ncx} - 1. \quad (17)$$

2. táblázat

A protonok elmozdulása a BR fotociklusának különböző lépéseiben

Átmenet	d_i (nm)	$d_i/2$ (nm)
K $\rightarrow$ L	-0,3	-0,15
L $\rightarrow$ M	+1,0	+0,5
M $\rightarrow$ O	+6,2	+3,1
O $\rightarrow$ BR	+3,0	+1,5

Az alapállapotban a BR molekulák extinkciós koefficiense $\lambda = 408$ nm-nél $\varepsilon_{BR} = 1,5 \cdot 10^4$ l mol⁻¹ cm⁻¹, az M állapotban 4×10^4 l mol⁻¹ cm⁻¹ [26], $x = 0,1$ mm. $\Delta I/I$ a 16c. ábráról leolvashatóan -32%. (17)-ből $n = 0,25$, $c = 2,9 \times 10^{-4}$ mol/l (külön meghatározásból), tehát a ciklusban résztvevő molekulák száma $N = n \cdot c \cdot V \cdot A = 7 \times 10^{14}$ (ahol $V = 0,4 \times 0,4 \times 0,1$ cm³ $0,4 = 1,6 \cdot 10^{-5}$ l besugárzott térfogat és $A = 6 \times 10^{23}$ az Avogadro szám). Ezt az N értéket használva a (14) egyenletből meghatározható d_i értékeket a 2. táblázatban gyűjtöttük össze. Az elmozdulások összege $\Sigma d_i = 10,5$ nm, amely a membrán vastagságának a kétszerese. Önmagában meglepő eredmény, hogy ilyen jó nagyságrendi egyezést sikerült kapni a töltések elmozdulásakor indukálódó áramok analíziséből. Ha elfogadjuk, hogy egyes szerzők szerint minden fotociklusban 2 proton halad át a membránon [30], akkor $d_i/2$ értékeket vehetjük a proton elmozdulásának egy-egy átmenetben (2. táblázat). Eszerint a K $\rightarrow$ L átmenetben a protonok visszafele ugranak $d_1 = 0,15$ nm-t, a többi átmenetben előre mozognak. A protonok a Schiff-bázisról előre haladnak az L $\rightarrow$ M $\rightarrow$ O átmenetekben, az összelmozdulás 3,6 nm, ekkor már kijutnak a felületre, az O $\rightarrow$ BR átmenetben (1,5 nm elmozdulás) a másik oldalról belépve ismét eljutnak a Schiff-bázishoz. Az elektromos jel adatai összhangban vannak azzal a szerkezeti adatokból nyert megállapítással [31], amely szerint a Schiff-bázis a belső oldalon kb. 1/3 távolságban helyezkedik el.

Az áthaladó protonok számát más módszerrel is meghatározhatjuk. A tranziens vezetőképesség változásból származó jel (16b. ábra) nyilvánvalóan függ az oldatba került protonok számától.

Az 5. részben meghatároztuk, hogy a vezetőképesség-jel $2,56 \times 10^{-4}$ Vs. Ezt $R = 10^5 \Omega$ munkaellenálláson kaptuk, tehát az áthaladt töltés $Q_p = \frac{2,56 \times 10^{-4}}{R} \text{ As} = 2,56 \times 10^{-9} \text{ As}$. Az áthaladó töltés mennyiségét meg-

kapjuk, ha megnézzük, hogy a megvilágítás hatására a megfelelő térfogatban mennyi áram folyik az alatt, míg a protonok szabadon vannak. Ehhez meg kell határozni egy proton fajlagos ellenállását. (pH = 7-nél, szobahőmérsékleten a víz fajlagos ellenállása $5,2 \times 10^6 \Omega \text{ cm}$. Egy protonra vonatkozik ebből $R_p =$

$= 3,26 \times 10^{20} \Omega \text{cm}$. ($\text{pH} = 7$ -nél a protonok száma $6 \times 10^{13} \text{ cm}^{-3}$). Könnyű belátni, hogy

$$Q_p = N_p \frac{V_{\text{old}} \cdot q \cdot \tau}{R_p \cdot l}, \quad (18)$$

ahol V_{old} a megvilágított részre eső feszültségesés, l az áramvezető hossza, q felülete, τ a protonok oldatban tartózkodásának átlagideje (az O állapot élet-tartama). Esetünkben $q = lx$, tehát $\frac{l}{q} = x = 0,1 \text{ cm}$, $\tau_4 = 2,2 \text{ ms}$, és $V_{\text{old}} \simeq 3 \text{ V}$. (A méréskor a feszültség $8,5 \text{ V}$, az oldatra esett $\simeq 6 \text{ V}$, és a lézerrel megvilágított felületre $\frac{0,4}{0,8} \times 6 = 3 \text{ V}$. Az elektródák távolsága $0,8 \text{ cm}$, a megvilágított felület szélessége $0,4 \text{ cm}$). Ezekkel a számadatokkal a (18) összefüggésből $N_p = 1,3 \times 10^{15}$, jó közelítéssel kétszerese az $N = 7 \times 10^{14}$ értéknek, amelyet abszorpció mérésekből kaptunk.

A számítás eredménye azt mutatja, hogy valóban annyi proton halad át a membránon, amennyi a (14) egyenletekbe helyettesítve a helyes membrán vastagságot adja. Felmerül a kérdés most már, hogy valóban 2 proton megy-e egy ciklusban, vagy a ciklusok aránya nem $n = 0,25$, hanem $n = 0,5$. Véleményünk az utóbbi érték felé hajlik, mert egyszerűbb megérteni az egy proton — egy ciklus arányt. Ez azonban azt jelenti, hogy ϵ_M irodalmi értéke nem helyes. A kérdés eldöntésére széles körű vizsgálatokat kezdünk.

Nagyon fontos megjegyeznünk az elektromos jel jellegzetességére vonatkozóan azt, hogy a protonok az átpumpálás után kikerülve az oldatba a membrán körül diffundálva nagyon gyorsan ekvilibrálnak. WITT vizsgálatai szerint [39] ez az idő a bíbormembránokhoz hasonló méretű tilakoidoknál (1. 2a rész) $\simeq 10 \mu\text{s}$. Esetünkben is ilyen nagyságrendben kell várnunk a protonpumpa hatására kialakuló koncentrációkülönbség — ami equivalens lenne elektromos potenciálkülönbség létezésével — eltűnését. Felmerül a kérdés, hogy a membránok megkerülésével $\simeq \mu\text{s}$ alatt visszafolyó töltés miért nem jelentkezik elektromos jelként. A magyarázat az, hogy a protonok elmozdulása a fehérjében kvantumugrás, rendkívül rövid impulzusok töltik a C kondenzátort (12. egyenlet), míg a lassú töltésmozgás nem tudja feltölteni a RC kört.

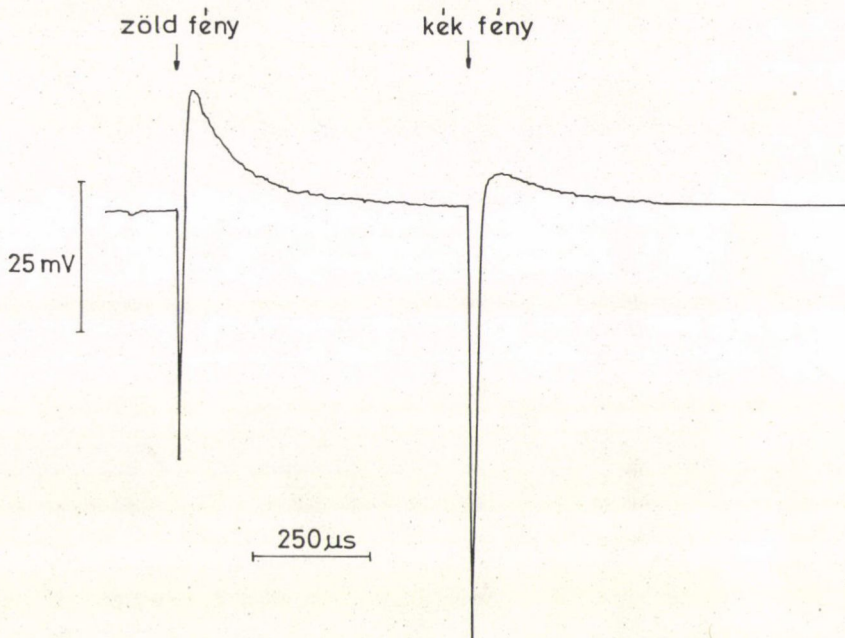
Az ekvibrálás nem érinti a lassú idejű elektromos jeleket, mert a protonok a fehérjén belül, a külső ionoktól elszigetelt állapotban mozognak.

7. Kék hatás, a protonok visszavétele

További fontos információkat nyerhetünk az elektromos jelekkel kapcsolatban az ún. kék hatás vizsgálata során. A kék hatás abban áll, hogy a BR molekulákat az M_{412} formában $\lambda \simeq 410 \text{ nm}$ hullámhosszú „kék” fényel be-

sugározva a protonpumpa leáll, a molekula a protonokat visszaveszi [21] és nagyon rövid idő alatt helyreáll az alapállapot [6, 20].

A kék hatás elektromos jelét a $\lambda = 580$ nm hullámhosszú első lézer impulzus után tetszés szerinti időben adható kék flash felvillantásával tanulmányoztuk (természetesen a bíbormembránokat előzőleg orientáltuk). A flash időtartama $2\mu\text{s}$, a fényhullámhossz $\lambda = 400$ nm $\Delta\lambda = 20$ nm sáv szélességgel és energiája 2 mJ volt. A 17. ábrán látjuk az egymásután ($600\mu\text{s}$) alkalmazott

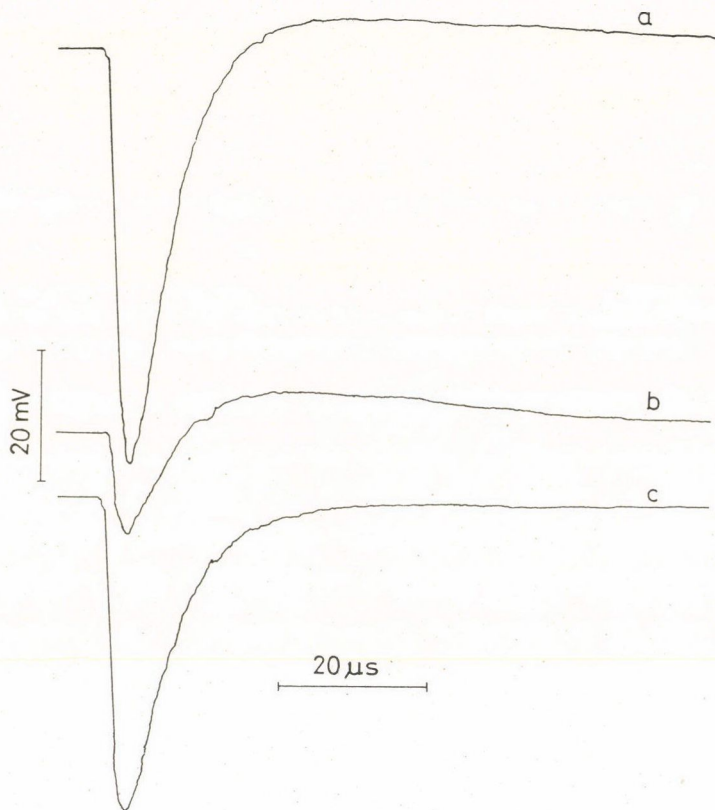


17. ábra. Elektromos jel orientált bíbormembránok esetén egymást követő zöld és kék gerjesztéskor. H_2O szuszpenzió, $A = 1.8$, $T = 20^\circ\text{C}$. Orientáló feszültség 10 V. Az elektródák távolsága $D = 0.8$ cm

zöld és kék fény jelét. A kék flash által keltett jel jellemzői erősen különböznek a zöld jelétől. A nagy negatív jel időállandója nagyobb, mint a zöld jelé, a pozitív rész amplitúdója jóval kisebb.

A kék fény nemcsak az M_{412} formát gerjeszti, hanem a BR_{570} -et is, mint-hogy az alapállapotban a molekula kékben is abszorbeál. Ezért a második jel a kék fény kék (M_{412}) és zöld (BR_{570}) hatásának az összege. A kék hatás jelét a 18. ábrán jelzett módon kaptuk. A 410 nm-es fény zöldhatását kifejező mérési adatokat (18b. ábra) levonjuk a 18a. ábrán levő összetett görbéből, a kapott eredmény (18c. ábra) némi hibával ($\approx 5\%$) a kék hatásnak megfelelő elektromos jel.

Szobahőmérsékleten a különbség jel egyetlen exponenciálisan eső negatív görbe, amelynek az időállandója $\tau_2 = 10 \mu s$. Kis hőmérsékleten ($5-10^\circ C$) egy pozitív előjelű gyors komponens is megjelent (19. ábra). A jel élettartama $\tau_1 \simeq 2 \mu s$, a berendezés felbontásának a határa. Ezért a jelet vizuális módszerrel rajzoltuk az ábrára, és állításunk csak annyi, hogy létezik. Regisztrálni $10^\circ C$ -nál magasabb hőmérsékleten nem sikerült, mert τ_1 , a hőmérséklettel erősen csökken.

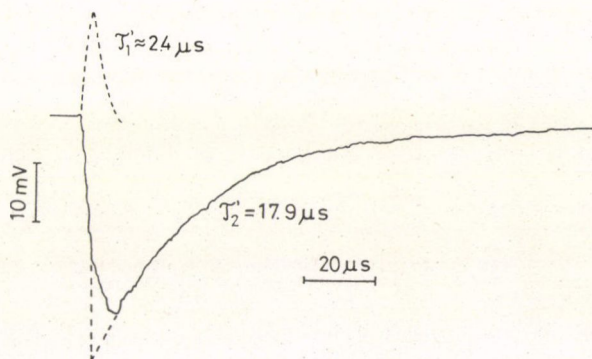


18. ábra. A kék flash-okozta jel felbontása: a) A jel abban az esetben, amikor a kék flash a zöld flash után érkezik $\Delta t = 600 \mu s$ idővel, b) a jel csak kék flash esetében, c) az (a) és (b) jelek különbsége. Ez a tiszta M_{412} jel

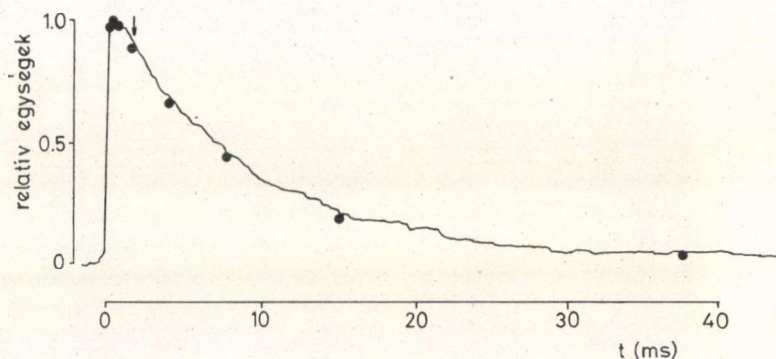
A 20. ábrán az M_{412} állapot optikai módszerrel megfigyelt bomlási görbéje és a kék fény hatására kapott elektromos válaszjel amplitúdója közti korrelációt mutatjuk be. Ez a korreláció bizonyítja, hogy az elektromos jel (a kivonás után) az M_{412} forma gerjesztésének tulajdonítható.

A H—D kicserélődési effektust is megmértük és azt kaptuk, hogy a τ_2 , időállandó 1,8-szor növekszik.

Az a tény, hogy a jel két komponenst tartalmaz, arra utal, hogy a fény indukált $M_{412} \rightarrow BR_{570}$ átmenet, vagyis a BR_{570} alapállapot helyreállása az M_{412} elektronikus gerjesztése után legalább 2 termikusan gerjesztett folyamatban történik. Az első folyamat, amelynek az elektromos jele pozitív, és élettartama



19. ábra. A kék fény okozta elektromos jel (lásd 18c ábra) $T = 5^\circ\text{C}$ hőmérsékleten. Két exponenciális komponens különböztethető meg, a szaggatott vonal a jel felbontása két komponensre



20. ábra. Az M_{412} állapot bomlásának (fényabszorpciós jel) és az elektromos jel amplitúdójának korrelációja

- : a fényabszorpció időbeli változása $\lambda = 400$ nm-nél;
 ● : az elektromos jel amplitúdója különböző késleltetési időknél.
 A jeleket a nyíllal jelzett pontnál normáltuk

(τ_1) nagyon rövid, szobahőmérsékleten valószínűleg megfelel a KALISKY et al. által spektroszkópiai úton észlelt gyors átmenetnek [20]. Ebben a munkában további átmeneteket nem találtak. LITVIN és BALASHOV azonban megfigyeltek két további közbenső formát is, spektroszkópiai úton [25]. A két forma abszorpciós maximuma 565 és 585 nm-nél az alapforma abszorpciós maximumához (570 nm) nagyon közel van, tehát nehéz felismerni.

Ezek szerint az $M_{412} \rightarrow BR_{570}$ átalakulás a következő átmenetek során valósul meg $M_{412} \rightarrow P_x \rightarrow P_{565} \rightarrow P_{580} \rightarrow BR_{570}$, ahol $M_{412} \rightarrow P_x$ átmenet a

nagyon gyors, foton gerjesztett elektronikus átmenet (ennek elektromos analógját nem látjuk hasonlóan a $\text{BR}_{570} \rightarrow \text{K}_{590}$ átmenethez), a $\text{P}_x \rightarrow \text{P}_{565}$ — átmeneteknek felel meg a τ_1 , időállandójú pozitív elektromos jel, τ_2 , élettartamú elektromos jel a két következő átmenet valamelyikének felel meg, valószínűleg a $\text{P}_{565} \rightarrow \text{P}_{580}$ átmenetnek. A következő átmenethez nem társul elektromos jel.

Az elektromos jeleket a (14) egyenlet alapján értékeltük ki, hogy a protonok elmozdulását (d_i) megkapjuk. Függetlenül elvégzett abszorpciós mérésekből megállapítottuk, hogy a kék flash hatására az M_{412} állapotban lévő molekulák 33 (± 2)-a jutott vissza a BR_{570} állapotba, a többi a szokásos $\text{M} \rightarrow \text{O} \rightarrow \text{BR}$ úton. Ezzel $d_1, \simeq +0,03$ nm $d_2, = 0,35$ nm. Az értékek abszolút hibája kb. 30%, amivel N értékének meghatározása pontatlan). d_2 , relatív hibája a zöld fény esetére meghatározott d_1 és d_2 értékekhez (2. táblázat) $\simeq 5\%$. d_1 , értéke azonban csak durva becslésnek tekinthető, mert τ_1 , az idő felbontásunk határán volt.

Az eredmények értelmezése nyilvánvaló: a molekula az M_{412} formából a kék fény hatására gyorsan visszajut a BR_{570} alapállapotba, amely azt jelenti, hogy az M_{412} formába eljutásig a protonok $d_1 + d_2 = 0,35$ nm-re jutottak a Schiff-bázisból és onnan $d_1, + d_2, \simeq -0,32$ nm-t léptek vissza. Tehát nagyon jó közelítésben $d_1 + d_2 + d_1, + d_2, \simeq 0$.

8. Következtetések

Kiinduló problémánk volt az élővilág energia átalakítási folyamataiban általánosan résztvevő protonpumpa mechanizmusának megértése. Úgy véljük, hogy a fenti vizsgálatokkal, amelyek a bakteriorodopszin molekulában működő fény hajtott protonpumpa működésére vonatkoznak, a probléma megoldásához hozzájárulunk. Megállapítottuk, hogy a Schiff-bázisról elinduló protonok a fény hatására perturbált molekula saját — kvantumállapotokon át történő — mozgása során meghatározott lépésekben jutnak ki a membrán külső felületére és lépnek be a Schiff-bázisra. A megállapítást a keletkező elektromos jel analízise alapján tettük. A protonok áthaladásának mélyebb részleteit — milyen oldalláncok közvetítésével, milyen energiák felhasználásával, a fehérje milyen belső szerkezeti mozgásai révén alakulnak ki a lépések stb. — további széles körű vizsgálatokkal lehet felderíteni. A kutatómunka végeredménye egy olyan BR molekula modell lehet, amely a szerkezet alapján magyarázza meg a protonpumpa működését.

Az elektromos jel sajátosságainak megértése vezetett a (14) egyenlethez, amely kvantitatív módon írja le a fehérjén belül, a fehérje által védett környezetben elmozduló töltés által egy külső körben indukált áramok idő függését. Láttuk, hogy ebből fontos adatokat kaphattunk a molekulán belüli töltés elmozdulások nagyságáról. Úgy véljük, hogy ilyen elektromos jelek más esetek-

ben is fellépnek — amikor valamilyen ionpumpa (Na, K, Ca, . . .) működik, vagy a fehérje működése közben a fehérjén belül töltött csoportok mozognak. Ezért érdemesnek tartjuk, hogy a fehérjék működése közben fellépő elektromos jelet elnevezzük: PERS (protein electric response signal).

Nagy valószínűséggel állíthatjuk, hogy a bakteriorodopszin rokon molekulájában, a látásért felelős rodopszinban azonos jelenségek játszódnak le fény hatására. Ismeretes, hogy retinogramokban, rod outer segmenteken és bizonyos rodopszint tartalmazó modell rendszerekben [5, 18, 36, 2] a flash gerjesztés után azonnal megjelenő két fázisú elektromos jelet lehet észlelni. A jelet korai receptor potenciálnak nevezik (ERP, early receptor potential). A jelek alakra megegyeznek a bakteriorodopszin PERS I. és II. komponensével (14. ábra). CONE kimutatta azt is [5], hogy a meta II. rodopszin formát (amely a bakteriorodopszin M_{412} formájának a megfelelője) megvilágítva nagy ellenkező előjelű ERP jelenik meg (itt is két komponens található). A két komponens pH és hőmérséklet függvényében különbözőképpen változik, pl. az ERP második komponense a csökkenő hőmérséklet hatására eltűnik.

Minthogy a [2] dolgozatban közölt eredmények szerint rodopszint és bakteriorodopszint tartalmazó membránrendszerekben fény hatására hasonló módon, hasonló előjelű membrán potenciál keletkezik, nyilvánvalónak látszik, hogy mindkét esetben fény hajtotta protonpumpa dolgozik.

Nagyon valószínűnek tartjuk a fentiek alapján, hogy az ERP nem más mint a rodopszin molekula PERS jelének első két komponense. Kvantitatív értékelésre ebben az esetben is a (14) egyenletet kell használni. Minden további nélkül megérthetjük az ERP második komponensének az eltűnését: pH változásra és hőmérséklet csökkenésre a komponens élettartama (τ_2) nő, a rate konstans k_2 csökken, ezért az amplitúdó is csökken és beleolvad a zajba.

A 2c. részben mondtuk, hogy a BR molekula tekinthető az élővilág legegyszerűbb protonpumpájának. További munkával, a jelen mérésben használt újszerű kísérleti módszerek továbbfejlesztésével elérhető, hogy PERS jeleket mérhessünk tilakoid és mitokondrium membránok esetében is.

A PERS az eddigi vizsgálatok alapján a fehérje működésének jelzője amelynek a megfigyeléséből értékes információkat nyerhetünk a belső történésekről. A PERS jel esetleges élettani jelentőségéről további vizsgálatok alapján lehet meggyőződni. Ezt a kérdést HONG is tárgyalja az ERP-jellel kapcsolatban [18].

A neuronális membránokon a Na és K csatorna nyílásával korreláltan ún. kapu áramot (gating current) figyeltek meg [14], amelyet úgy értelmeznek, hogy dipólok mozdulnak el, és ezek kapacitív áramot keltenek. Nagy valószínűséggel állíthatjuk, hogy a gating current is a PERS egyik megnyilvánulása.

Ezt úgy értelmezhetjük, hogy a gerjesztő áram a membránon nagy elektromos teret hoz létre, amely a 4. részben leírt módon a fehérjék elektromos dipóllal rendelkező részeit, vagy az egész fehérjét mozgásra kényszeríti. Ennek

következtében csatornák nyílhatnak, zárulhatnak stb. A töltött részek mozgása PERS típusú jelet indukál.

A dolgozatban leírtunk egy újszerű kísérleti módszert. Ez abban áll, hogy membrán darabokat elektromos térrel bizonyos időre orientáltunk és az orientált mintákon végezzük további kísérleteket. A módszer fontos jellemzője az, hogy a membránok minden további kezelés (liposzóma építés, modell membránhoz való ragasztás stb.) nélkül állanak a kísérletező rendelkezésére. Kiegészítő mérésekkel meg lehet győződni a membránok mennyiségéről, méretelosztásáról (pl. fényszórással) orientáltsági fokáról. Várható tehát, hogy a különböző jellegű mérések kvantitatívva tehetők. Úgy véljük, hogy a módszer jól alkalmazható membránhoz kötött fehérjék működésének és bizonyos esetekben szerkezetének a tanulmányozására.

9. Köszönetnyilvánítások

A dolgozatban leírt munkák bizonyos fázisaiban közvetlenül részt vettek Ormos Pál és Dancsházy Zsolt; segítséget nyújtottak az elektronika terén Tóth Ferenc (KFKI) és Gárgyán József, a számításokban Fajszai Csaba és Pósfai János. Valamennyiüknek köszönetet mondok. A munkákat részben támogatta az Országos Műszaki Fejlesztési Bizottság.

IRODALOM

1. APPLEBURY, M. L., PETERS, K. S. and RENTZEPIS, P. M.: *Biophys. J.* **23**, 375 (1978).
2. BOLSHAKOV, V. I., DRACHEV, A. L., DRACHEV, L. A., KALAMKAROV, G. R., KAULEN, A. D., OSTROVSKII, M. A. and SKULACHEV, V. P.: *Dokl. Akad. Nauk, USSR* **249**, 1462 (1979).
3. BOYER, P. D.: *Ann. Rev. Biochemistry* **47**, 957 (1978).
4. CHERRY, R. J.: *Biochim. Biophys. Acta* **559**, 289 (1979).
5. CONE, R. A.: *Science* **155**, 1128 (1967).
6. DANCSHÁZY, Zs., DRACHEV, L. A., ORMOS, P., NAGY, K., and SKULACHEV, V. P.: *FEBS Letters* **96**, 59 (1978).
7. DANCSHÁZY, Zs., MARDEN, M. C. and KESZTHELYI, L.: to be published.
8. DRACHEV, L. A., KAULEN, A. D. and SKULACHEV, V. P.: *FEBS Letters* **87**, 161 (1978).
9. EISENBACH, M., WEISSMANN, Ch., TANNY, G. and CAPLAN, R. S.: *FEBS Letters* **81**, 77 (1977).
10. EVANS, R. D.: *The Atomic Nucleus*, pp. 470, McGraw-Hill, London, New York, Toronto.
11. FREDERICQ, E. and HOUSIER, C.: *Electric Dichroism and Electric Birefringence*, Clarendon Press, Oxford (1973).
12. GANGLIANO, A. G., GEACINTOV, N. E. and BRETON, J.: *BBA* **461**, 460 (1977).
13. GEACINTOV, N. E., van NOSTRAND, F., BECKER, J. F. and TINKEL, J. B.: *BBA* **267**, 65 (1972).
14. GILLY, W. F. and ARMSTRONG, C. M.: *Biophys. J.* **29**, 485 (1980).
15. GOVINDJEE, RAJNI and GOVINDJEE: *Sci. American*, December p. 68 (1974).
16. HESS, B. and KUSCHMITZ, D.: *FEBS Letters* **100**, 334 (1979).
17. HEYN, M. P., CHERRY, R. J. and MÜLLER, U. J.: *Mol. Biol.* **117**, 607 (1977).
18. HONG, F. T.: *Bioelectrochem. and Bioenerg.* **5**, 425 (1978).
19. HONG, F. T. and MONTAL, M.: *Biophys. J.* **25**, 465 (1979).
20. KALISKY, O., LACHISH, U. and OTTOLENGHI, M.: *Photochem. Photobiol.* **28**, 261 (1978).
21. KARVALY, B. and DANCSHÁZY, Zs.: *FEBS Letters* **76**, 36 (1977).
22. KESZTHELYI, L.: *BBA* **598**, 429 (1980).

23. KESZTHELYI, L. and ORMOS, P.: FEBS Letters **109**, 189 (1980).
24. KORENSTEIN, R. and HESS, B.: FEBS Letters **89**, 15 (1978).
25. LITVIN, F. F. and BALASHOV, S. P.: BIOFIZIKA **22**, 1111 (1977).
26. LOZIER, R. H., BOGOMOLNI, R. A. and STOECKENIUS, W.: Biophys. J. **15**, 955 (1973).
27. LURIA, S. H.: Sci. American, December **30**, p. 30 (1975).
28. MITCHELL, P.: Nature **191**, 144 (1961).
29. OESTERHELT, D. and STOECKENIUS, W.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **70**, 2852 (1973).
30. ORT, D. R. and PARSON, W. W.: Biophys. J. **25**, 341 (1979).
31. OVCHINNIKOV, Yu. A., ABDULAEV, N. G., FEIGINA, M. Yu., KISELEV, A. V. and LOBANOV, N. A.: FEBS Letters **100**, 219 (1979).
32. SHINAR, R., DRUCKMANN, S., OTTOLENGHI, M. and KORENSTEIN, R.: Biophys. J. **19**, 1 (1977).
33. SIMONYI, K.: Physikalische Elektronik, Teubner, Stuttgart pp. 649 (1972).
34. SINGER, S. J. and NICOLSON, R. L.: Science **175**, 720 (1972).
35. STOECKENIUS, W., LOZIER, R. H. and BOGOMOLNI, R. A.: Biochim. Biophys. Acta **505**, 215 (1979).
36. TRISSL, H.-W.: Photochem. Photobiol. **29**, 579 (1979).
37. TRISSL, H.-W. and MONTAL, M.: Nature **266**, 655 (1977).
38. WITT, H. T.: Biochem. Biophys. Acta **505**, 355 (1979).
39. WITT, H. T. and ZICKLER, A.: FEBS Letters **37**, 307 (1973).