

B4012

Membránfehérje-töltésátrendeződések detektálása három dimenzióban

PhD értekezés tézisei



Oroszi László

Témavezető: Dér András

MTA Szegedi Biológiai Központ, Biofizikai Intézet
Szeged, 2003.

BEVEZETÉS

A biomembránok által elválasztott térrészekben lévő elektrolit ionjainak eloszlását és ennek eredményeképpen a transzmembrán potenciálkülönbséget a membránokban található ionszarnak és ionpumpák szabályozzák. A biológiai energiaátalakítás és jelátvitel folyamataiban alapvető jelentőségű ez a szabályozás. Az ionpumpák működésének és az elektrolit dinamikai viselkedésének megértése ezért egyike a biofizika legfontosabb feladatainak.

A *Halobacterium salinarum* baktérium sejtmembránjának bñormembrán részéi speciális fehérje-festék komplexet, bakteriorodopszint (bR) tartalmaznak. A fehérje fény hatására protont pumpál a sejten belüli térből a sejten kívüli térbe, ami hozzájárul a protonok eloszlásának asszimetriájához a membrán két oldalán. Ezen elektromos asszimetriában tárolt energiát a baktérium életfolyamataiban hasznosítja. A bR a legegyszerűbb ismert aktív ionpumpa, illetve biológiai energiaátalakító rendszer. A molekuláris működés viszonylagos egyszerűsége folytán a fehérje modellként szolgál a biológiai energiaátalakítás alapvető összefüggéseinek tanulmányozásához.

A fehérje működésének alapja a fénnel történő gerjesztés hatására elinduló ún. fotokémiai ciklus (fotociklus), amelynek során a molekula több lépésből álló, termikus gerjesztésű reakciókon keresztülhaladva jut vissza alapállapotába. A molekula kvázistabil köztes állapotokon (intermediereken) megy keresztül, miközben a folyamat eredményeként egy proton halad át a membránon. Az intermedierek részben eltérő abszorpciós spektrummal rendelkeznek és a fotociklus praktikusán követhető spektroszkópiai módszerekkel.

A széles körben folytatott optikai mérésekkel párhuzamosan módszerek alakultak ki a bR működését kísérő elektromos jelek rögzítésére is. Megállapították, hogy a fotociklust kísérő fotoelektromos és abszorpciókinetikai változások időbeli korrelációban vannak egymással. Ebből a tényből adódott az a felismerés, hogy a fotoelektromos mérési adatok a molekulán belüli töltésmozgások következményeként értelmezhetők. Fontos hangsúlyozni, hogy a fotoelektromos mérések a spektroszkópiai mérésektől független információt hordoznak.

A bR molekuláris szinten történő leírására több, részben egymást kizáró molekuladinamikai modellt állítottak fel a közelmúltban. A modellek közös jellemzője, hogy azok számításaikba beépítenek számos, a fehérje működésére vonatkozó, kísérletileg nyert információt, köztük spektroszkópiai megfigyeléseket. A modellek érvényessége természetesen nem vizsgálható ezen információk alapján. Ezzel ellentétben az ún. szuszpenziós módszerrel végrehajtott fotoelektromos mérések megfelelő kiértékelésével lehetséges a fotociklus egyes intermedierjeinek dipólusmomentumaira kvantitatív módon következtetni. Ez módot ad az egyes molekuladinamikai térszerkezetek ellenőrzésére és így az adott modell érvényességének vagy éppen tarthatatlanságának megállapítására.

Az értekezés egyik fő célja az ionpumpák működésének vizsgálatára kifejlesztett szuszpenziós (illetve gél) módszer elméleti megalapozása, a kvantitatív kiértékelés tárgyalása, a makroszkopikusan detektálható elektromos feszültségjel értelmezése a molekuláris szinten lezajló intramembrán töltésátrendeződések szintjéről indulva.

A szigorú tárgyaláshoz szükség van az intramembrán töltésátrendeződések hatására lejátszódó ionrelaxációs folyamatok megfelelő szintű ismeretére. A feladat megoldásához, azaz az elektrolit dinamikai modellezéséhez egy módosított Brown-dinamikai modellt és

annak számítógépes implementációját fejlesztettem ki. A létrehozott szimulációs rendszert az elektrolit Debye-Hückel elmélet szerinti árnýékoló hatásának modellezése alapján ellenőriztem. Miután megállapítottam a folytonos elmélet es a modell előrejelzéseinek kvantitatív egyezését, a szimulációs rendszert az ionrelaxáció problémájára alkalmaztam. Meghatároztam az elektrolit - pillanatszerű intramembrán dipólusmomentum-változás (töltésugrás) hatására lejátszódo - árnýékolási folyamatának sebességét. Az ionrelaxáció sebességét egy membránkorong esetében, mind a membrán normálisa, mind az arra merőleges irányú dipólusmomentum-változás esetére megadtam. A szimulációk alapján megállapítottam, hogy az ionrelaxáció kinetikai értelemben anizotróp (a membrán síkjába eső dipólusmomentum-változás hatására lejátszódo ionrelaxáció gyorsabb). Kimutattam, hogy a kinetikai anizotrópia a membránt körülvevő diffúz kettősréteg hiányában is megvalósul, de annak jelenléte jelentősen növeli az effektust. További modellezés alapján adódott, hogy az ionrelaxációs folyamat igen jó közelítéssel lineáris a szuszpenziós módszer tipikus mérési körülményei között, valamint, hogy az ionrelaxáció kinetikáját nem befolyásolják az intramembrán dipólusmomentum-változás megvalósításának konkrét molekuláris részletei. Az ionrelaxáció fenti tulajdonságai (adott sebesség, anizotrópia, linearitás, intramembrán részletekre való érzéketlenség) együtt egy olyan feltételrendszert alkotnak, amellyel lehetségessé vált a szuszpenziós módszer szigorú elméleti megalapozása. A szuszpenziós módszerrel nyerhető mérési adatok kiértékelésével pedig molekuladinamikai modellek ellenőrzésére nyílik mód.

Az elméleti fejtegetéseken túl, az értekezés részét képezi a szuszpenziós módszer egy konkrét alkalmazása is, a bR két molekuladinamikai modelljének vizsgálata a fotoelektromos mérések alapján. A molekuladinamikai térszerkezetekből számítható

dipólusmomentumok és a kísérletek alapján nyerhető értékek között figyelemreméltó egyezés mutatkozott az egyik modell esetében. Az elméleti és kísérleti értékek bizonytalanságában potenciálisan szerepet játszó számos körülményt ismerve ez igen biztató eredménynek tekinthető. Mindezek alapján remélhető, hogy a modellezési és mérési technikák tökéletesedése nyomán, módszerünkkel kiválasztható lesz a bR protonpumpa működését helyesen leíró molekuladinamikai modell. Egy ilyen modell alapvető tudományos jelentőséggel bírna, hiszen egy ionpumpa molekuláris szintű leírását jelentené.

Munkám egyik közvetlen célja a szuszpenziós módszer elméletének megalapozása az ionrelaxációs folyamatok dinamikai modellezésére építve. Az elektrolit dinamikai szimulációjához létrehozott modellt és számítógépes implementációt másfelől önmagában fontos eredménynek tartom, hiszen alkalmazhatósága túlmutat az ionrelaxáció problémakörén. A rendszer, flexibilitása révén, az elektrolit mezoszkopikus mérettartománybeli dinamikai jelenségeinek feltárásában jelent általánosan használható eszközt.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. A szuszpenziós módszer elméleti megalapozása.

Szigorú elméleti megalapozását adtam a szuszpenziós módszerek:

- a. A "tökéletes irányítású minta" absztrakt problémájára megadtam a makroszkopikusan mérhető (foto) feszültség és az azt létrehozó molekuláris töltésmozgások közötti fizikai kapcsolat kvantitatív elméleti leírását (II).
- b. Az a. pont elméleti esetére visszavezetve tárgyaltam az egyes orientálási/rendezési módszerekhez tartozó bonyolultabb minta-anizotrópiák eseteit, a fotoszelekció alkalmazásának lehetőségeit (II).

2. Háromdimenziós fotoelektromos mérések bakteriorodopszin mintán.

- a. Létrehoztam egy, a háromdimenziós szuszpenziós módszerrel történő mérések tervezését, értelmezését segítő számítógépes programot (II).
- b. Az a. pont alapján megadtam egy mérési eljárást a minta - méréseknél kritikus szerepet játszó - rotációs pozicionálásának megvalósítására, amely közvetlenül a (foto)elektromos feszültségejeleket használja fel (II).
- c. Az a. pont alapján megadtam egy mérési eljárást a membránsíkba eső "y komponens" meghatározására nem tökéletesen orientált minták esetében (II).
- d. Közreműködtem a bakteriorodopszinon végzett fotoelektromos mérésekben, a kísérleti eredmények kiértékelésében, illetve azoknak molekuladinamikai modellekkel történő összevetésében (I).

3. Ionrelaxáció - modell és implementáció.

- a. Kidolgoztam egy módosított Brown-dinamikai modellt az elektrolit mezoszkopikus skálán történő dinamikai modellezésére és létrehoztam a modell számítógépes implementációját. A modell-rendszer egy – felületi töltésekkel és intramembrán dipólusokkal konfigurálható - membránkorongot és az azt körülvevő elektrolitot tartalmazza egy diffúziós falakkal rendelkező szimulációs térfogatban. Az implementációban a modell-rendszer összes fizikai paramétere módosítható. "Virtuális mérőműszereket" hoztam létre, amelyekkel a szimulált elektroliton méréseket végeztem. A szimulációs eszköz a modell-rendszer komponenseinek, változásainak (membrán, felületi töltések, intramembrán dipólusmomentumok, ionok, virtuális mérőműszerek) nyomonkövetésére háromdimenziós nézetet szolgáltat (III).
- b. Ellenőriztem a modell, illetve az implementáció megbízhatóságát az elektrolit Debye-Hückel elméletével való összehasonlítás alapján az ionrelaxációs szimulációknál alkalmazott fizikai paraméteregyüttes (elektrolit összetétel, hőmérséklet, szimulációs paraméterek) mellett. Megállapítottam a Debye-Hückel elmélet és a szimulációkból származtatott Debye-hossz kvantitatív egyezését (III).

4. Ionrelaxáció - szimulációk.

Pillanatszerű (az ionrelaxációs folyamatok időskáláján) intramembrán töltésátrendeződéseket kísérő ionrelaxációs folyamatokat modelleztem. Az elektrolit - membránkorongban létrehozott pillanatszerű dipólusmomentum-változásra adott - válaszában modellezésével a következőket állapítottam meg:

- a. Meghatároztam az ionrelaxációs folyamathoz rendelhető felezési időt a membrán síkjára merőleges és azzal párhuzamos irányú pillanatszerű dipólusmomentum-változás esetében, rögzített biomembrán-elektrolit konfiguráció (geometria, felületi töltések, elektrolit összetétel, hőmérséklet) mellett (III).
- b. Az a. pont alapján megállapítottam a relaxációs folyamat kinetikai anizotrópiáját a membrán síkjával párhuzamos és az arra merőleges irányokban (III).
- c. Megmutattam, hogy az ionrelaxáció kinetikai anizotrópiája a felületi töltésektől megfosztott membrán esetében, azaz a diffúz kettősréteg hiányában is jelentkezik, de a töltött membránt körülvevő diffúz kettősréteg jelenléte szignifikánsan fokozza azt (III).
- d. Megállapítottam az ionrelaxáció kinetikájának linearitását egy olyan tartományban, amely tartalmazza a szuszpenziós módszer mérési körülményeit (III).
- e. Kimutattam, hogy az ionrelaxáció kinetikája érzéketlen az intramembrán dipólusháló eltolására a molekuláris mérettartományban, amiből arra következtettem, hogy a dipólusmomentum-változás konkrét molekuláris megvalósulása nem befolyásolja az ionrelaxációs folyamatot, és így a szuszpenziós módszer elmélete szerint a makroszkopikusan detektálható feszültségjel alakját sem. Ez lehetővé teszi, hogy a (foto)elektromos mérés alapján kvantitatív módon következzünk a molekuláris dipólusmomentumokra (III).

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

I. Andás Dér, László Oroszi, Ágnes Kulcsár, László Zimányi, Rudolf Tóth-Boconádi, Lajos Keszthelyi, Walther Stoeckenius, Pál Ormos (1999) Interpretation of the spatial charge displacements in bacteriorhodopsin in terms of structural changes during the photocycle. Proc. Natl. Acad. Sci. 96: 2776-2781.

II. László Oroszi, András Dér, Pál Ormos (2002) Theory of electric signals of membrane proteins in three dimensions. European Biophysics Journal. 31: 136-144

III. László Oroszi, Olaf Hasemann, Elmar Wolff, András Dér (2002) Modeling of ionic relaxation around a biomembrane disk. Bioelectrochemistry. 60:97-106

EGYÉB KÖZLEMÉNYEK

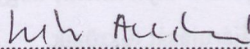
Pál Ormos, László Fábán, László Oroszi, Elmar K. Wolff, Jeremy J. Ramsden, András Dér (2002) Protein-based integrated optical switching and modulation. Applied Physics Letters. 80: 4060-4062

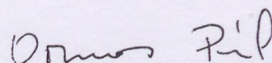
Zoltán Szabó, Zsolt Tokaji, János Kálmán, László Oroszi, Anikó Pestenác, Zoltán Janka (2003) The effect of bright light exposure on pupillary fluctuations in healthy subjects. Journal of Affective Disorders. *Elfogadva. Nyomdában. Online elérhető.*

TÁRSSZERZŐI LEMONDÓ NYILATKOZAT

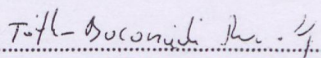
Alulírott nyilatkozom, hogy a jelölt téziseit ismerem, a tézisekben foglalt tudományos eredményeket tudományos fokozat megszerzéséhez nem használtam föl, és tudomásul veszem, hogy azokat ilyen célból a jövőben sem használhatom föl.

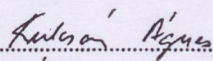
2003. november 20.

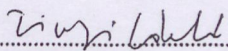

.....
Dér András


.....
Ormos Pál


.....
Keszthelyi Lajos


.....
Tóth-Boconádi Rudolf

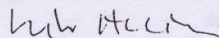

.....
Kulcsár Ágnes


.....
Zimányi László

NYILATKOZAT

Alulírott, Dér András, Oroszi László témavezetőjeként kijelentem, hogy az értekezésben felhasznált eredmények a jelölt hozzájárulását tükrözik.

Szeged, 2003. december 8.



Dér András