

1. A támogatott kutatás menete, az azt befolyásoló történések, változások

1.1 Technikai előrehaladás

A 2005-ös évben jelentős technikai fejlesztést hajtottunk végre, melyet kisebb részben jelen OTKA pályázat, nagyobb részben egy GVOP műszerpályázat támogatott. Az OTKA terhére az alábbi értékesebb beszerzések történtek: egy asztali számítógép, egy Clark típusú oxigén elektróda, melyre külön engedélyt kaptunk, asztali keverő, hűtőszekrény, kvarcküveták. A GVOP pályázat támogatásával a régi diódasor detektorunkat kapuzott CCD kamerára cseréltük ki, és új optikai asztalt vettünk. Ugyancsak a jelen OTKA pályázat tette lehetővé egy perisztaltikus pumpa vásárlását, és a ciklus végén, az OTKA külön engedélyével, hozzájárulásunkat egy spektrométer beszerzéséhez. A CCD kamera jelentősen javította a kinetikus abszorpciós spektroszkóp berendezésünk időfelbontását, valamennyit javított a spektrális felbontáson és az A/D konverzió felbontásán, azaz a jel/zaj viszonyon. Mindazonáltal az abszorpciós mérések zaját továbbra is a mérőfény fotonzaja határozza meg, és ezen csak több átlagolással vagy hosszabb expozíciós idővel lehet javítani, de mindkettőnek korlátai vannak. Az átlagolások számát a minta fényérzékenysége, kémiai (redox) stabilitása korlátozza, az expozíciós idő növelése pedig a legrövidebb időtartományokban korlátozza a mérés időfelbontását. A mérések kiértékelését, a modellezést a pályázatból megvalósított szoftvervásárlás segítette elő.

1.2 A korábbi, hagyományos kutatási témák folytatása

A pályázat éveiben folytattuk a korábban elkezdett együttműködések és a korábbi (OTKA által támogatott) kutatásokat is. Noha ezek témája szigorúan véve nem szerepelt jelen pályázat tervei között, mégis úgy tekintjük, hogy jelen pályázat támogatásával haladtak előre, tekintettel arra, hogy a vezető kutatónak nem állt más forrás rendelkezésére. A közös motívum az elmúlt négy évben művelt különböző területek között a bioenergetikával való szoros kapcsolat, a spektroszkópiai módszerek dominanciája és ezek kemometria alapú kiértékelése, illetve a kemometria módszerek menet közben elvégzett tökéletesítése.

1.3 A pályázat főbb célkitűzéseinek megvalósulása, illetve az ezektől való eltérés

A pályázat egyik fontos célkitűzése (ló szívizom) citokróm-c mutánsainak tervezése és termelése volt *E. coli*-ban annak érdekében, hogy megfelelő fotoaktív jelölés után fényindukált elektrontranszport méréseket végezzünk. A holocitokróm előállításának utolsó lépését, a hem kofaktor kétszeres kovalens kötését a fehérje két cisztein oldalláncához, a hem liáz fehérje katalizálja. Ezért az élesztőből származó hem liáz génjét is be kell vinni az *E. coli*-ba, és a két fehérjét együtt kell kifejezni. Munkánk jelentős része ennek a rendszernek a tökéletesítése volt minél nagyobb citokróm hozam elérése érdekében. Menetközben kiderült azonban, hogy a holocitokróm éréséről, a hem liázról magáról, valamint a hem liáz és az apocitokróm, illetve a hem liáz és a hem kölcsönhatásáról nagyon keveset lehet tudni annak ellenére, hogy a citokróm c az egyik legfontosabb és legelterjedtebb fehérje az élővilágban, továbbá a hem liáz bizonyos mutációi letális betegséget okoznak. Ezért munkánk természetes kiegészítéseként elkezdtük a hem liáz tisztítását és jellemzését, és a tisztított hem liáz segítségével a citokróm in vitro érésének vizsgálatát. Ráadásul azt is megfigyeltük, hogy a saját citokróm érésben deficiens *E. coli* gazdasejtben,

amihez nem adtuk hozzá az élesztő hem liáz génjét, mégis képződhet érett citokróm, noha nagyon kis hatásfokkal, ami arra utal, hogy a hem liáz chaperonként segíti a hem és az apocitokróm kovalens kapcsolatának létrejöttét. A kérdés fontossága és érdekessége miatt a ciklus második felében egyre nagyobb figyelmet fordítottunk erre a kutatási irányra.

Terveinknek megfelelően számos citokróm c mutánst hoztunk létre abból a célból, hogy a TUPS (8-thiouredopyrene-1,3,6-trisulfonate) fotoaktív jelölővel kovalensen jelölve, kinetikus abszorpciós spektroszkópiai módszerrel mérjük az elektrontranszfer sebességét a fehérje belsejében. Lizineket és néhány lizint helyettesítő ciszteint, valamint további mutációval bevezetett ciszteineket jelöltünk. A pályázat fő célkitűzéseivel összhangban sok adatot gyűjtöttünk a citokróm belsejében lezajló elektrontranszfer távolság- és irányfüggéséről, ami lehetővé teszi a fehérje felszínének hozzávetőleges feltérképezését elektrontranszfer-hatékonyság szempontjából. A tervezett kettős mutánsokból az valósult meg, melynek esetében a jelölhető cisztein melletti másik mutáció nagymértékben megváltoztatta a hem kofaktor redoxpotenciálját. Ennek a kettős mutánsnak a tulajdonságai nagyjából a várakozásnak megfelelően változtak meg a vad típushoz képest. Ugyanez a kettős mutáns szerepelt a terveinkben, mint potenciálisan hatékony elektrondonor a citokróm c oxidáz enzim nagysebességű redukálására, az oxidázban lezajló elektrontranszport lépések jobb időfelbontással való megmérésére. Kísérleteink tanúsága szerint azonban a mutáns citokrómban az improduktív, visszafelé történő elektrontranszfer is felgyorsul, és a citokróm oxidáz redukációjának hatékonysága vagy emiatt, vagy a kettős mutáció által okozott enzimaktivitás-csökkenés miatt nem elegendő jó minőségű kinetikus mérések elvégzésére. Az eltelt időszakban elvégzett számos kísérlet egyben olyan szempontból is óvatosságra intett bennünket, hogy a TUPS fotoaktív jelölőt se tekintjük „csodafegyvernek“, mert egyrészt meglehetősen fényérzékeny, ami a gerjesztések ismétlési számát és ezzel a jel/zaj viszonyt korlátozza, másrészt a flexibilitása bizonyos esetekben multiexponenciális elektrontranszfer kintetikát eredményez, ezzel nehezítve a kísérletek értelmezését.

A pályázatban röviden említett másik redoxfehérjén, a *Thiocapsa roseopersicina* két c-típusú hemet és egy flavint tartalmazó citokróm c552 fehérjéjén még nem kezdődtek el az elektrontranszfer mérések. Ennek oka az, hogy jelen pályázat résztvevője, Bagyinka Csaba és munkatársai részben ennek a pályázatnak a támogatásával egy új, két c típusú hemet tartalmazó citokrómot találtak a *T. roseopersicinában*, ezt tisztították, de novo fehérje-szekvenálták, jellemezték és kristályosították. Jelen pályázat tehát elősegítette ezeknek a nagy jelentőségű eredményeknek a megszületését is. Tekintve, hogy újonnan felfedezett fehérjéről van szó, melyben két redox centrum (a két c típusú hem) található, és ezek között feltehetőleg belső elektrontranszfer zajlik, nagyon érdekes lehet ennek a molekulának a vizsgálata elektrontranszfer-kinetika szempontjából. Ehhez azonban célszerű előbb megismerni a fehérje fizokokémiai tulajdonságait és szerkezetét, és a kutatások éppen ebbe az irányba haladnak.

A pályázat utolsó évében érdeklődésünk részben egyes bioenergetikában fontos és nem melléleg színes (látható fényt elnyelő, illetve fluoreszkáló) fehérje esetleges biofotonikai, illetve szenzoros technikai felhasználása felé is fordult. Ennek kiváltója egyrészt a napjainkban általánosan megfigyelhető tendencia a gazdaságilag hasznosítható kutatások előnyben részesítésére (és az ebbe való részleges és kényszerű beletörődés), valamint egy mostanra már gyümölcsözőnek mondható külföldi együttműködés elindulása volt. A franciaországi Montpellier egyetemével való együttműködés keretében kétfajta vékonyréteg szerkezetbe juttatunk fehérjéket,

aminek távlati célja új tulajdonságokkal rendelkező hibrid anyagok létrehozása. Az egyik hordozó a polielektrolit alapú vékonyrétegek sorozata. Ezzel a technikával olyan fehérjebarátt közeget lehet létrehozni, amely – ellentétben sok szilárd felülettel – megőrzi az adszorbeált fehérjék természetes szerkezetét és aktivitását. Tekintettel arra, hogy a polielektrolit sokréteg (angolul: multilayer) elektromos vezető tulajdonságokkal rendelkezik, igen nagy az érdeklődés ezek felhasználása iránt biokompatibilis elektródok készítésére. A másik hordozó, mellyel kísérleteket végeztünk, porózus szilíciumból kialakított sokréteg. Ez az anyag alkalmas fotonikus szerkezetek (eszközök) létrehozására azáltal, hogy a fény hullámhosszával összemérhető periodicitású törésmutató-változásokat lehet benne létrehozni. A periodikusan változó törésmutatót például egymás felett elhelyezkedő rétegekben létrehozva Bragg-tükröt vagy mikrokavitást lehet építeni. A törésmutató a rétegek lyukacsosságával állítható be. Ugyanez a tulajdonság lehetővé teszi, hogy molekulákat – a mi esetünkben fehérjéket – adszorbeáltassunk a porózus szerkezetbe, akár kovalens kötéssel is. Az így funkcionizált, porózus szilícium alapú hibrid anyagok érdekes, nemlineáris optikai tulajdonságokkal rendelkeznek, és tekintettel a szilícium hordozó félvezető jellegére, várhatóan optoelektronikai alkalmazásokra is módot adhatnak.

2. A pályázat főbb eredményei^{1,2}

2.1 Rekombináns citokróm c mutánsok előállítása, ennek optimalizálása

Folytattuk a rekombináns citokróm c mutánsok előállításának és termeltetésének optimalizálását abból a célból, hogy TUPS fotoaktív redox festékekkel jelölve a cisztein mutánsokat tanulmányozhassuk a citokróm c fehérje egyes tartományainak elektronvezető képességét, illetve optimális rendszert állítsunk elő a citokróm oxidáz enzim mechanizmusának vizsgálatához. A citokróm c (ló szív) és a heme kovalensen bekötő enzim, a heme liáz (élesztő) együttes kifejezésére két stratégiát dolgoztunk ki. A rendszer stabilitásának, valamint a hozam növelésének érdekében közös plazmidba, az arabinóz operon erőteljes P_{BAD} promóterét tartalmazó pBAD24 vektorba foglaltuk a két fehérje génjét, és ezt több gazdasejten kipróbáltuk. A szabályozhatóság érdekében a plazmid tartalmazza az *araC* gént, amelynek terméke indukció hiányában negatív, az indukálóanyag jelenlétében viszont pozitív regulátora a promóternek. Így a megfelelő induktor molekulával, az arabinózzal a termékátírás szigorúan szabályozható, ugyanis a megfelelő időben indítható el az expresszió. Az expresszió körülményeit változtatva végül 35 mg/L citokróm hozamot sikerült elérni. Másrészt kétplazmidos konstrukciót is létrehoztunk, ahol a két fehérje külön plazmidokban kódolt, azzal a céllal, hogy a - feltehetőleg - chaperonként működő heme liázból a sejtek ne kelljen feleslegesen a termék citokrómhoz hasonló kópiaszámot előállítania. A rekombináns citokróm c mutánsok előállítására és termeltetésére az a módszer bizonyult eredményesebbnek, amikor a citokróm c és a heme liáz génjét közös plazmidba foglaltuk, és ehhez a termeltetéshez a megfelelő gazdasejtet is megtaláltuk. Ugyanakkor a külön plazmidos kifejezés előnye az, hogy ilyen módon csak a heme liáz vagy csak az apocitokróm c termelésére nyílt lehetőség.

A.1.1. Tenger, K., Khoroshyy, P., Kovács, K.L., Rákhely, G. and Zimányi, L. 2007. Heterologous overexpression of eukaryotic cytochrome c and cytochrome c heme lyase in *Escherichia coli* for biophysical studies. Regional Biophysics Conference, Balatonfüred, Hungary, p.92.

C.1.2. Tenger, K., Khoroshyy, P., Kovács, K.L., Zimányi, L. and Rákhely, G. 2007. Improved system for heterologous expression of cytochrome c mutants in *Escherichia coli*. Acta Biol. Hung. 58:23-35. IF=0,636

2.2 Lizin-cisztein csere, az elektrontranszfer kovalens úthosszának változtatása

A kétplazmidos rendszerrel három lizin – cisztein cserét hajtottunk végre, és kifejeztük a megfelelő, K39C, K8C és K87C mutáns fehérjéket. A K39C és K8C rekombináns citokróm c mutánsokat megjelöltünk TUPS fotoaktív kovalens festékekkel. Ez a két aminosav körülbelül azonos távolságra van a heme kofaktortól, de a fehérje két áttellenes oldalán. A K8 a citokróm c dokkoló tartományában van, a K39 viszont az ellenkező, elektrontranszfer szempontjából valószínűleg inaktív tartományban. Az eredeti lizineken jelölt molekulákon korábban már végeztünk elektrontranszfer méréseket. Most a mutánsok lézergörjesztése után mértük az elektrontranszfer kinetikáját a TUPS és a heme között, mikor a TUPS gerjesztett tripllett elektront ad át az oxidált heme-nek, majd visszaveszi azt. Az elektrontranszfer kinetikát mind a

¹Részletesebb beszámoló ábrákkal illusztrálva a még nem publikált eredményekről készült.

² A publikációk jelölése: A: absztrakt, C: *in extenso* folyóiratcikk, P: referált, *in extenso* proceedings

lizinen, mind a ciszteinen jelölt molekulák esetén a maximum entrópia – nemnegatív legkisebb négyzetes módszerrel exponenciálisokkal illesztettük, és megállapítottuk, hogy az elektron visszatérése a festékre több exponenciális összegével írható le. Ugyancsak kimutattuk, hogy ezek sebességi állandója nincs a Marcus elméletben szereplő szoros összefüggésben a TUPS és a hem közötti távolsággal, például a lizinnel ciszteinnel való helyettesítésekor a kovalens útvonal a két kofaktor között egy lépéssel megnő, és az elektrontranszfer mégis felgyorsul. A multiexponenciális folyamatot azzal modelleztük, hogy a TUPS gyűrűs szerkezete a flexibilis kovalens kapcsolat miatt több helyzetet foglalhat el a fehérje felszínéhez képest, ami heterogenitáshoz vezet. Ilyen helyzeteket molekuladinamikai számításokkal azonosítottunk. A HARLEM program segítségével kiszámoltuk ezen konformációk esetén az optimális elektrontranszfer útvonalat, és megállapítottuk, hogy az elektron nem követi a festéket a fehérjéhez kötő kovalens útvonalat, hanem van der Waals távolságon belül átugrik a fehérjére a TUPS gyűrűs pi-elektron rendszeréről.

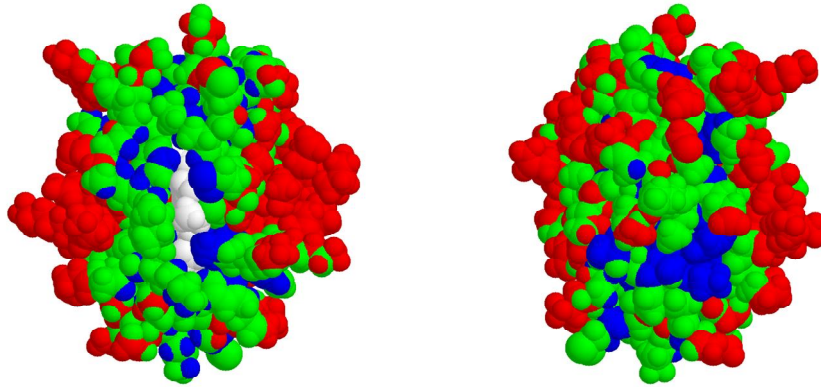
A2.1. Tenger, K., Rákhely, G., Khoroshyy, P. and Zimányi, L. 2005. Expression, purification and labeling of recombinant horse cytochrome c, and measurements of photoinduced intraprotein electron transfer. Regional Biophysics Meeting, Zrece, Slovenia, p.61.

A2.2. Tenger, K., Khoroshyy, P., Leitgeb, B., Rákhely, G., Borovok, N., Kotlyar, A. and Zimányi, L. 2005. Complex electron transfer kinetics between the photoactive label TUPS and the heme of cytochrome c. Eur. Biophys. J. 34(6):665.

C2.3. Tenger, K., Khoroshyy, P., Leitgeb, B., Rákhely, G., Borovok, N., Kotlyar, A., Dolgikh, D.A. and Zimányi, L. 2005. Complex kinetics of the electron transfer between the photoactive redox label TUPS and the heme of cytochrome c. J. Chem. Inf. Mod. 45(6):1520-1526
IF=2,810

2.3 A citokróm c felszínének feltérképezése elektrontranszfer-hatékonyság szempontjából

A fentiek mellett még tizenegy aminosavat cseréltünk ki a citokróm c felszínének különböző pontjain ciszteinre, és részletesen vizsgáltuk az elektrontranszfer kinetikáját a hem kofaktor és a TUPS között. A jelölt fehérjék között volt az első olyan kettős mutáns is, melyben a második mutáció a hem kofaktorának redoxpotenciálját változtatta (ld. alább). Modellszámításokat végeztünk a citokróm c összes atomja és a hem kofaktor közötti elektrontranszfer hatékonyságára: Kiszámítottuk az elektrontranszfer útvonalakat, az azokhoz tartozó kvantummechanikai kapcsolódás erősségét (coupling strength) a két általánosan használt modell szerint (Dutton modell ill. Gray-Beratan-Onouchic modell). Bizonyos jelölő-pozíciók esetén széleskörű hőmérsékletfüggést is tudunk mérni, és ezzel kísérletileg is meghatároztuk a kapcsolódás erősségét. Megállapítható volt, hogy mindkét modell kielégítően egyezik a kísérleti eredményekkel az adott mérési pontosság mellett. Ugyanakkor érdekes, hogy a számítások szerint a citokróm c „poláris“ régiói irányában hatékonyabb elektrontranszfer útvonalak adódnak, mint az „egyenlítői“ régiók irányában (mindkettő a hem síkjához viszonyítva). Mindenesetre a különbségek nem jelentősek, feltehetőleg azért, mert a citokróm c meglehetősen kis fehérje. Nagyobb fehérjékben, hosszabb távú elektrontranszfer esetén várhatóan nagyobb jelentősége lenne a jó kapcsolatot biztosító (kovalens) útvonalaknak.



1. ábra. A citokróm c felszínének térképe „előlről és hátulról“ a hem irányába történő elektrontranszfer hatékonysága szempontjából (a hem színe fehér). A piros atomoktól indulva az elektrontranszfer hatékonyabb, a kékekből indulva kevésbé hatékony, mint amit a hemtől számított egyszerű távolságfüggés indokolna.

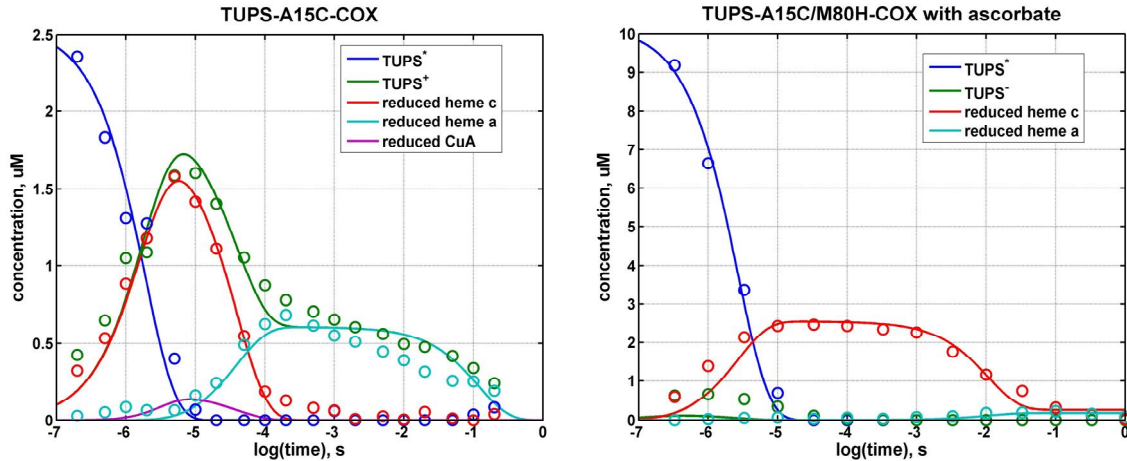
A.3.1 Khoroshyy, P., Tenger, K. and Zimányi, L. 2006. Intra- and interprotein photoinduced electron transfer in respiratory chain redox proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1757(14):187.

További közlemény várható két éven belül.

2.4 Elektrontranszfer a citokróm c és a citokróm oxidáz között

A citokróm oxidáz enzim ciklusának elindításához a citokróm c A15C mutánsát állítottuk elő és jelöltük a TUPS fotoaktív molekulával. A lézer-kinetikai kísérletek tanúsága szerint ebben a rendszerben ugyan kellőképpen gyors a gerjesztett TUPS-ról a citokróm c hemjére történő elektrontranszport, ami a jó időfelbontás előfeltétele, de a fordított irányú elektrontranszport is gyors, és ezért a citokróm oxidáz irányába történő, „hasznos“ elektrontranszport hatásfoka túl kicsi. Mindazonáltal megfigyelhető volt a citokróm oxidáz hem-a kofaktorának redukciója, és az, hogy a CuA kofaktor (az első az elektrontranszfer láncban) igen gyorsan, 100 nanoszekundumnál gyorsabban kap elektront a citokróm c-től. Ennek a lépésnek az időfelbontását ezzel jelentősen megjavítottuk az irodalmi adatokhoz képest.

A hem vasatomját koordináló metionin 80 aminosavat is kicseréltük hisztidinre, és ezzel olyan mértékű potenciálváltozást értünk el, amivel a citokróm c már aszkorbinsavval nem redukálható. Az M80H/A15C kettős mutáns az első olyan termékünk, melyet arra kívántunk használni, hogy a citokróm c-ről a citokróm oxidázra lehetőleg gyorsan tudjunk elektront eljuttatni, de megakadályozzuk az elektron gyors visszatérését. Ebben a kísérletben az aszkorbinsav szerepel elektrondonorként a fotooxidált TUPS számára, így az elektrontranszfer elvileg egyirányúvá tehető. Az első ilyen kísérletek citokróm oxidázzal azonban abba a technikai nehézségbe ütköztek, hogy a kettős mutáns citokróm esetében az oxidáz enzimaktivitása lecsökkent, ami a két fehérje közötti elektrontranszfer hatásfokának csökkenésében nyilvánult meg.



2. ábra. A TUPS-citokró-m-citokró-m oxidáz rendszerbeli elektrontranszfer követése kinetikus spektroszkó-piai adatok illesztése révén. A baloldali ábra az A15C mutáns citokró-m, a jobboldali az A15C/M80H kettős mutáns citokró-m esetét mutatja. Utóbbi esetben aszkorbinsavat használtunk elsődleges elektrondonorként.

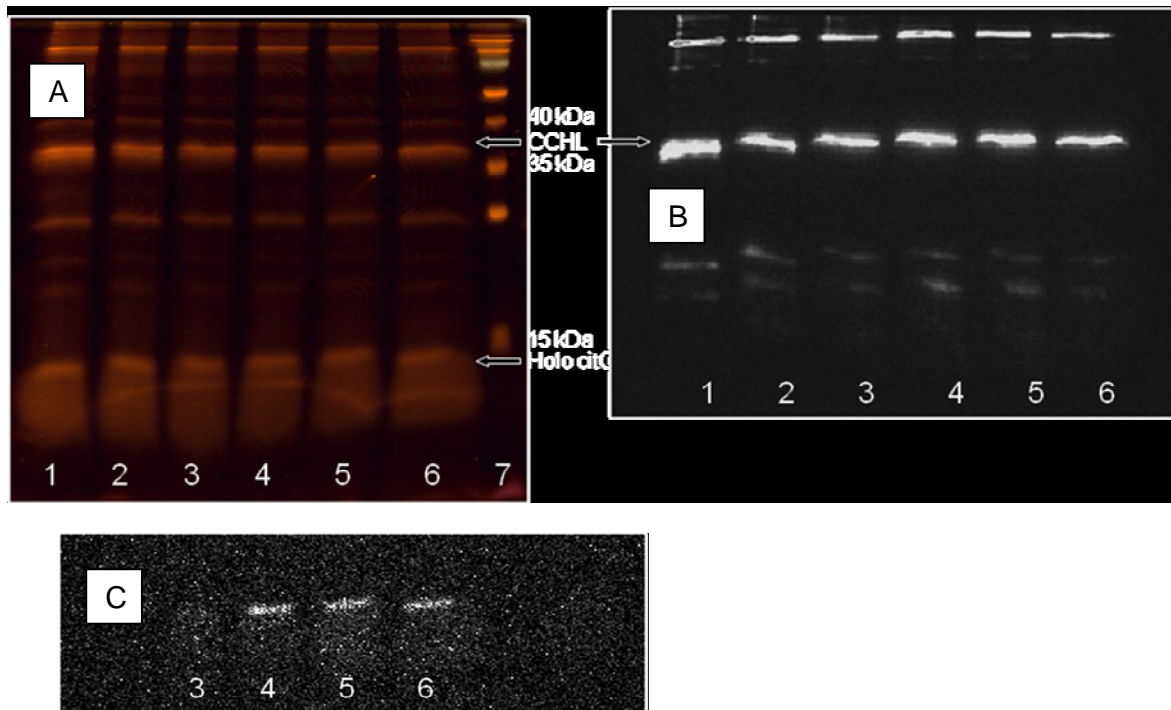
A.4.1 Khoroshyy, P., Tenger, K. and Zimányi, L. 2007. Tuning of the electron transfer rate by the altered redox potential of heme c in cytochrome c and in its complex with cytochrome c oxidase. Regional Biophysics Conference, Balatonfüred, Hungary, p.114.

A.4.2 Khoroshyy, P., Tenger, K. and Zimányi, L. 2008. Tuning the electron transfer rate by the redox potential of cytochrome c in complex with cytochrome c oxidase. Biochim. Biophys. Acta 1777:S90.

További közlemény várható két éven belül.

2.5 A citokró-m c érése in vivo és in vitro, a hem liáz jellemzése

Tudomásunk szerint elsőként sikerült heterológ expresszióval kifejeznünk és tisztítanunk az élesztő hem liáz fehérjéjét, mely a Ccm-III-as citokró-m c érési rendszer prototípusa. A Ccm-III-as a gombák, gerinctelenek és gerincesek mitokondriumaiban működő citokró-m c érési rendszer, mely egyetlen hem liáz fehérje segítségével katalizálja a hem kovalens kapcsolódását az apocitokró-mhoz és egyben a citokró-m c natív szerkezetének kialakulását. Az érett holocitokró-m c fehérje több módszerrel is kimutatható. Abszorpciós spektruma jellegzetes csúcsokkal rendelkezik (Soret sáv a közeli ultraibolyában, α és β sáv a látható tartományban), és a spektrumból a fehérje redox állapota is kiolvasható. A c típusú, tehát a hemet kovalensen kötő citokró-m azonosításának másik módja a hem kimutatása kemilumineszcenciás módszerrel a fehérje SDS gélen futtatott sávjában (a nem kovalensen kötött hem nem marad együtt a fehérjével). Tisztított hem liázzal és heterológ expresszióval előállított apocitokró-mmal, illetve vásárolt holocitokró-mból a hem kivonásával előállított apocitokró-mmal hem hozzáadása után vizsgáltuk az *in vitro* citokró-m érés feltételeit, körülményeit (3. ábra).



3. ábra. *In vitro* citokróm c érés eredménye. A: SDS PAGE fehérje festés után, B: a hem liáz (CCHL) kimutatása a hozzákötött 6xHis tag immundetekciójával nitrocellulóz membránra blotolás után, C: hem kimutatása az SDS gélen ECL-lel ugyanazon a helyen, ahol a citokróm c sávja található. 1: apocitokróm + CCHL, 2: apocitokróm + CCHL + hem, 3: apocitokróm + CCHL + hem + redukálószer, 4, 5, 6: 10 perces, 30 perces és 1 órás inkubáció

Az apocitokróm heterológ expressziója során azt a meglepő megfigyelést tettük, hogy valamennyi holocitokróm (a spektrum alapján) hem liáz nélkül is termelődik az *E. coliban*. Ezért hasonló kísérleteket megismételtünk olyan mutáns *coli* törzsben is, melyben a baktérium saját citokróm érési rendszere ki volt iktatva. Ezzel igazoltuk, hogy kis mennyiségben ugyan, de holocitokróm képződik spontán módon is, hem liáz segítségével nélkül. Feltételezhető tehát, hogy a hem liáz chaperonként segíti a holocitokróm feltekeredését, a hemmel való konstruktív komplexképződést és végül a kovalens kötés kialakulását.

A hem liáz az SDS gélen valamivel nagyobb molekulásúlyúnak látszik, mint a szekvenciából számolt molekulásúlya. Joggal feltételezhető, hogy a szabad hemmel és az apocitokrómmal is kölcsönhatásba kell lépnie. Ezért érdemes lesz megvizsgálni, hogy vajon nem szerkezetnélküli fehérjével van-e dolgunk – legalábbis a hem és apocitokróm partnerek távollétében. Ennek első lépéseként az SZBK Enzimológiai Intézete munkatársai által kidolgozott IUPRED szerver segítségével megállapítottuk, hogy a predikció szerint a hem liáz szekvenciájának teljes első fele szerkezetnélküli, és a két tipikusan hemet kötő CPV motívum ebben a tartományban helyezkedik el.

A.5.1 Tenger, K., Khoroshyy, P., Rákhely, G. And Zimányi, L. 2008. Heterologous overexpression of eukaryotic cytochrome c and cytochrome c heme lyase to study the mechanism of cytochrome c maturation. *Biochim. Biophys. Acta* 1777:S90.

További közlemény várható két éven belül.

2.6 A *Thiocapsa roseopersicina* új, két hemet tartalmazó citokróm c4 fehérjéje

Jelen pályázat résztvevője (Bagyinka Csaba) jelentős előrelépést tett a fotoszintetikus bíbor kénbaktérium *Thiocapsa roseopersicina* két hemet tartalmazó citokróm c4 fehérjéjének kristályosításában, részben jelen pályázat támogatásával. Elsőként sikerült anaerób szervezetből származó citokróm c4 fehérjét kristályosítani. A röntgendiffrakciós mérés kiváló minősége előrevetíti a közeljövőben a fehérje 1,72 angstromos felbontású szerkezetének meghatározását. Redoxpotenciáljából ítélve ez a fehérje feltehetőleg a végső oxidázhoz közel lát el elektrontranszfer funkciót a sejt légzési foszforilációjának folyamatában. Ugyancsak sikerült de novo fehérjeszekvenálás módszerével meghatározni a fehérje aminosav szekvenciáját.

C.6.1 Tomcova, I., Branca, R.M.M., Bodó, G., Bagyinka, C. and Smatanova. I.K. 2006. Cross-crystallization method used for the crystallization and preliminary diffraction analysis of a novel di-haem cytochrome c4. *Acta Cryst.* F62:820–824. IF=1,401

C.6.2 Branca, R.M.M., Bodo, G., Varkonyi, Z., Debreczeny, M., Osz, J. and Bagyinka, Cs. 2007. Oxygen and temperature-dependent structural and redox changes in a novel cytochrome c4 from the purple sulfur photosynthetic bacterium *Thiocapsa roseopersicina*. *Arch. Biochem. Biophys.* 467:174-184. IF=3,152

C.6.3 Branca, R.M.M., Bodo, G., Bagyinka, Cs. And Prokai, L. 2007. De novo sequencing of a 21-kDa cytochrome c4 from *Thiocapsa roseopersicina* by nanoelectrospray ionization ion-trap and Fourier-transform ion-cyclotron resonance mass spectrometry *J. Mass Spectr.* 42:1569–1582. IF=3,574

2.7 Hibrid polielektrolit-bakteriorodopszin sokréteg létrehozása, jellemzése

Megvizsgáltuk annak lehetőségét, hogy polielektrolit sokrétegre, illetve annak belsejébe el lehet-e helyezni fehérjét tartalmazó membránfragmentumokat, nevezetesen a bakteriorodopszin-tartalmú bíbor membránt. A kérdés jelentősége abban áll, hogy transzmembrán ionpumpák (ezek prototípusa a bakteriorodopszin) vagy pl. receptorok beépítése ilyen hibrid struktúrákba újfajta érzékelők, elektródok, biokompatibilis anyagok létrehozását teheti lehetővé. Megállapítottuk, hogy a negatív ösztötléssel és permanens elektromos dipólusmomentummal rendelkező bíbor membránok pozitív felső réteggel végződő polielektrolit hordozóra két rétegben és orientáltan rakódnak le, és a polielektrolit felvitele a negatív komponenssel indítva tovább folytatható a bíbor membránok tetején. Még érdekesebb az a megállapítás, hogy negatív felső polielektrolit rétegre is felvihető egy réteg bíbor membrán, és az építkezés folytatható a pozitív elektrolit-komponenssel. A megfigyeléseket elektrosztatikus és hidrofób kölcsönhatásokkal, illetve kinetikus hatásokkal tudtuk magyarázni. A bíbor membránok orientált elhelyezkedése és annak kimutatása, hogy a fehérje ebben a környezetben gyakorlatilag megőrzi natív szerkezetét, biztató a polielektrolit sokréteg – membránfehérje hibrid anyagok jövőbeli felhasználása szempontjából.

C.7.1 Saab, M., Estephan, E., Cloitre, T., Legros, R., Cuisinier, F.J.G., Zimányi, L. and Gergely, Cs. 2009. Assembly of purple membranes on polyelectrolyte films. *Langmuir*, közlésre elfogadva. IF=4,009

2.8 Bakteriorodopszin és glükóz oxidáz porózus szilícium fotonikus struktúrákban

Partnereink szilícium lapon kontrollált elektrokémiai maratás útján váltakozó törésmutatójú porózus szilícium rétegek sorozatát hozzák létre, és a fényhullámhosszal összemérhető rétegvastagságok beállításával egydimenziós fotonikus kristályokat tudnak készíteni. A porózus szilíciumba különböző anyagokat bejuttatva, és szilanizálás után akár kovalensen is bekötve törésmutató-változások idézhetők elő, és így a fotonikus kristály pl. spektrumeltolódással, érzékenyen reagál az adszorpcióra. A legérzékenyebb fotonikus szerkezetet, a két Bragg-tükörből és a köztük lévő egyetlen, kétszeres vastagságú rétegből álló mikrokavitást használtuk arra, hogy két bioenergetikai és spektroszkópiai szempontból is érdekes fehérjét, a glükóz oxidázt és a (szolubilizált) bakteriorodopszint adszorbeáltassuk. Infravörös reflexiós spektroszkópiával, fluoreszcenciás, atomerő és elektronmikroszkópiai módszerrel, valamint multifoton mikroszkópiával jellemeztük az így kialakított hibrid félvezető – biofotonikus struktúrákat. Különösen érdekes a multifoton mikroszkópiás megfigyelés, mert ezzel elsőként sikerült háromdimenziós, szubmikron felbontású képet alkotnunk a fotonikus szerkezet belsejéről. Megállapítottuk, hogy a porózus szilícium a gerjesztő femtoszekundumos, infravörös lézerefény fókuszában másodharmonikus gerjesztésre képes és kétfotonos fluoreszcencia-emissziót végez. Fehérjékkel funkcionálizálva a porózus szilícium belsejét a fehérjék maguk is másodharmonikus gerjesztővé és kétfotonos fluoreszcencia-emitterekké válnak, ami különösen a bakteriorodopszin esetében érdekes, ez a fehérje ugyanis önmagában nem fluoreszkál. A mikrokavitás középső, kettős rétege különösen aktív nemlineáris optikai jelenségek szempontjából.

A.8.1 Zimányi, L., Martin, M., Palestino, G., Cloitre, T., Cuisinier, F.J.G. and Gergely, C. 2008. Hybrid protein-semiconductor photonic structures using bacteriorhodopsin and glucose oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* 1777:S91.

A.8.2 Zimányi, L., Martin, M., Palestino, G., Cloitre, T., Cuisinier, F.J.G. and Gergely, Cs. 2009. Incorporation and multitechnique detection of biomacromolecules in porous silicon photonic structures. *Regional Biophysics Conference, Linz, Austria*, p.49.

P.8.3 Palestino, G., Martin, M., Agarwal, V., Legros, R., Cloitre, T., Zimányi, L. and Gergely, Cs. 2008. Detection and light enhancement of glucose oxidase adsorbed on porous silicon microcavities. In: *Porous Semiconductors – Science and Technology, Materials of the 6th international conference (Canham, Nassiopoulou, Sailor and Schmuki eds.)* 117-118.

P.8.4 Martin, M., Saab, M., Cloitre, T., Estephan, E., Legros, R., Cuisinier, F.J.G., Zimányi, L. and Gergely, Cs. 2008. A multitechnique study of bacteriorhodopsin's photonics towards new optical devices. *Proc. of SPIE* 6991: 69910A1-10.

C.8.5 Palestino, G., Martin, M., Agarwal, V., Legros, R., Cloitre, T., Zimányi, L. Gergely, Cs. 2009. Detection and light enhancement of glucose oxidase adsorbed on porous silicon microcavities. *Phys. Stat. Solidi C, közlésre elfogadva*.

További közlemény várható két éven belül.

2.9 A bakteriorodopszin fotociklusának újabb részletei

Folytattuk a bakteriorodopszin fotociklusának teljes leírását célzó kemometriai kutatásokat. Kifejlesztettük az exponenciális illesztéssel segített „önmodellezés“ (SVD-EFASM) módszerét, és ezzel analizáltuk a vad típusú bakteriorodopszinon mért kinetikus spektrumsorozatokat. Kimutattunk egy eddig fel nem ismert eltolódást az L intermedier spektrumában. Ennek figyelmen kívül hagyása okozta minden korábbi kísérlet kiértékelésében azt, hogy a fotociklus korai szakaszára nem lehetett pontos kinetikus modellt illeszteni azzal a megszorítással, hogy az intermedierek össz mennyisége állandó. Az L intermedier tehát valójában két, egymás után következő, spektrálisan hasonló, de mégis elkülöníthető állapotra bontható, és megadtunk egy lehetséges szerkezeti magyarázatot is arra, hogy a két L állapot molekuláris szinten miben különbözhet egymástól.

A.9.1 Zimányi, L., Saltiel, J., Brown, L.S. and Lanyi, J.K. 2005. A priori resolution of the intermediate spectra and kinetics in the bacteriorhodopsin photocycle by singular value decomposition with exponential-fit-assisted self-modeling. Regional Biophysics Meeting, Zrece, Slovenia, p.58.

C.9.2 Zimányi, L., Saltiel, J., Brown, L.S. and Lanyi, J.K. 2006. A Priori Resolution of the Intermediate Spectra in the Bacteriorhodopsin Photocycle: The Time Evolution of the Spectrum Revealed. J. Phys. Chem. A 110(7):2318-2321. IF=2,639

2.10 Egy új retinálfehérje, a karotenoid antennával rendelkező xanthorodopszin kinetikus spektroszkópai jellemzése

Korábbi együttműködés folytatásaként elvégeztük egy új retinálfehérje, a xanthorhodopsin kinetikus spektroszkópai vizsgálatát. A xanthorhodopsin az első antennával rendelkező retinálfehérje, melynek fotociklusát és protonpumpáló aktivitását mind a retinál, mind a járulékos pigment salinixanthin fényvel való gerjesztése elindítja (az utóbbi a gerjesztési energia átadásával). Alacsony és magas pH-n mérve a teljes fotociklust időfelbontott sokcsatornás abszorpciós módszerrel megállapítottuk, hogy a preparációtól függően a fotociklus során kb. pH 6 alatt nem deprotonálódik a Schiff bázis, mert a protonakceptor csoport tartósan protonálva van. Ilyenkor nincs nettó töltéstranszport aktivitás sem. Kimutattuk, hogy a statikus, pH-titrálással kiváltott abszorpcióváltozások, melyek feltehetőleg a salinixanthinnak a rodopszin töltésállapotával összefüggő elektrokróm abszorpcióváltozásai, a fotociklus közben, azaz kinetikusán is fellépnek. Tehát a karotenoid antenna egyben érzékeny riportere is a fotociklus, azaz töltéstranszport közben fellépő elektrosztatikus és konformációs változásoknak. Ehhez hasonlót az eddig ismert retinálfehérjékben természetesen nem lehetett megfigyelni, hiszen azokhoz nem kapcsolódik karotenoid antenna. A fotociklus részletes leírása folyamatban van.

Közlemény várható két éven belül.

2.11 Példa a kemometriai módszer továbbfejlesztésére: glikolitikus oszcillációk és hullámok elemzése infravörös spektrumok alapján

Szingularisérték felbontáson (SVD) alapuló módszerrel analizáltunk Fourier Transzformációs Infravörös (FTIR) spektrumsorozatokat, melyeket német partnereink mértek élesztő kivonaton olyan körülmények között, mikor a glikolízis intermedierek koncentrációi oszcilláló kinetikát, majd térbeli reakciós-diffúziós hullámokat mutatnak. A módszert továbbfejlesztettük a wavelet analízis bevezetésével. Így sikerült a korábbiaknál jobban szétválasztani az oszcillációkat (hullámokat) a lassú

eltolódásoktól és a nagyfrekvenciás zajoktól. Sikerült a legtöbb intermedier vegyület koncentrációjában elkülönítve kimutatni az oszcilláció meglétét, és az oszcillációk fázisviszonyai is jórészt megfeleltek az irodalomból ismert - de sokkal rosszabb időfelbontással megmért - fázisviszonyoknak. Ugyancsak sikerült megmutatni, hogy az oszcilláló glikolízis egyes intermedierjei csoportosíthatók az oszcilláció hullámalakja szerint, tehát az oszcilláló, illetve térbeli hullámzást mutató reakció időbeli változása távolról sem mutat szinuszos alakot. A módszer jelentősége az, hogy nem-invázív, gyors, és kiváló időfelbontást nyújt.

A.11.1 Khoroshyy, P., Zimányi, L., Mair, T., Müller, A. and Müller, S.C. 2005. Chemometric analysis of the oscillatory kinetics of glycolytic intermediates in a yeast extract from data measured by FTIR-spectroscopy. Regional Biophysics Meeting, Zrece, Slovenia, p.89.

C.11.2 Mair, T., Zimányi, L., Khoroshyy, P., Müller, A. and Müller, S.C. 2006. Analysis of the oscillatory kinetics of glycolytic intermediates in a yeast extract by FTIR-Spectroscopy. Biosystems 83:188-194. IF=1,016

C.11.3 Zimányi, L., Khoroshyy, P., Hauser, M.J.B and Mair, T., 2009. Chemometric approach towards the dissection of glycolytic oscillations and waves by the noninvasive method of FTIR spectroscopy. Physica D, közlésre benyújtva.