

A LIPID-FEHÉRJE KÖLCSÖNHATÁSOK ÉS A
MEMBRÁNDINAMIKA SZEREPE A BIOLÓGIAI FUNKCIÓBAN.

AZ INFRAVÖRÖS SPEKTROSKÓPIAI MEGKÖZELÍTÉS

AKADÉMIAI DOKTORI ÉRTEKEZÉS

SZALONTAI BALÁZS

Magyar Tudományos Akadémia
Szegedi Biológiai Központ
BIOFIZIKAI INTÉZET

2005

TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítések jegyzéke	6
ELŐSZÓ	7
IRODALMI ÁTTEKINTÉS	10
A BIOLÓGIAI MEMBRÁNOK	10
<i>Lipidek</i>	12
A lipidek infravörös spektroszkópiája	12
A lipidek fázis állapotára, konformációjára jellemző paraméterek az infravörös spektrumban:.....	14
CH ₂ bólogató rezgés eloszlás (wagging progression)	14
C-H nyújtási rezgések	15
Az izotóp-helyettesítés lehetőségei membrán lipidek tekintetében:	17
Kívülről bevitt molekulák alkalmazása.....	17
<i>In situ</i> deuterálás	17
<i>In vivo</i> deutérium jelölések	19
<i>Fehérjék</i>	21
A fehérjék infravörös spektroszkópiája	22
A fehérje spektrumok felvétele	23
Az amid I sáv	24
Az amid I sáv felbontása második deriválttal	25
Az amid I sáv felbontása Fourier ön-dekonvulációval	27
Az amid I tartomány hozzárendelése a fehérje másodlagos szerkezetéhez	29
Az amid II sáv	29
<i>Lipid-fehérje kölcsönhatások</i>	31
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	34
ANYAGOK	34
MÓDSZEREK.....	35
<i>Fourier transzformációs infravörös spektroszkópia (FTIR)</i>	35

Transzmissziós abszorpciómérések.....	35
Teljes visszaverődéses (ATR) mérések.....	36
<i>Kiértékelési módszerek.....</i>	37
A rendezett és rendezetlen lipid zsírsavlánc szegmensek hozzájárulásának szétválasztása a νCH_2 sávokban (Saját eredmény [S1])	37
Az egy-komponenses, illetve a két-komponenses $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ sáv illesztés hibája:	46
Az amid I sáv komponenseinek meghatározása. (Saját eredmény [S2]) .	47
EREDMÉNYEK ÉS DISZKUSSZIÓ.....	52
BIOLÓGIAI PROBLÉMÁK.....	52
<i>Fotoszintetizáló szervezetek hőmérséklet adaptációjának vizsgálata.....</i>	52
A membránlipidek telítetlenségének szerepe cianobaktériumokban [S3]	52
Előzmények	52
A vad típusú Synechocystis PCC6803 sejtek membrán lipidjei:	54
Membránlipidek mutáns Synechocystis PCC6803 sejtekben:	59
A fehérje/lipid arányok.....	61
Lipidek a stressz hőmérsékletek érzékelésében? [S4].....	66
A foszfatidil-glicerol membránszerkezeti szerepe a magasabb rendű növények hidegtűrésében [S5]	68
Előzmények	68
A transzgenikus növények lipid és zsírsavösszetétele	70
A C-H rezgési tartomány analízise.....	71
A fény szerepe a hőmérséklet adaptációban [S6].....	75
A karotinoidok lehetséges szerepe a hőmérséklet adaptációban [S7].....	81
MEMBRÁNFIZIKAI PROBLÉMÁK:	89
<i>Lipid-fehérje kölcsönhatások</i>	89
<i>A lipid-fehérje kölcsönhatás dinamikája.....</i>	95
A nehézfém ionok hatása a tilakoid membránok dinamikájára [S8].....	95
A lipidekre, illetve a fehérjékre jellemző paraméterek hőmérsékletfüggésének összehasonlítása.....	97
A lipid fehérje kölcsönhatás tanulmányozása H→D kicserélődéssel	100
H→D kicserélődés dohány tilakoidban.....	103

H→D kicserélődés cianobakteriális tilakoidban	108
ÖSSZEFOGLALÁS.....	113
A DOLGOZATBAN FELHASZNÁLT SAJÁT KÖZLEMÉNYEK.....	120
HIVATKOZÁS JEGYZÉK.....	121

Rövidítések jegyzéke

ATR	teljes visszaverődéses (Attenuated Total Reflection) infravörös spektroszkópiai módszer
FTIR	Fourier transzformációs infravörös
<i>desA</i>	a Δ^{12} deszaturált kódoló gén
<i>des B</i>	az ω^3 deszaturált kódoló gén (mindig a zsírsavlánc végétől visszafele számított harmadik kötést teszi telítetlenné)
<i>des C</i>	a Δ^9 deszaturált kódoló gén
<i>des D</i>	a Δ^6 deszaturált kódoló gén
ESR	Elektronspin rezonancia
GPAT	glicerol foszfát acil-transzferáz (enzim)
$\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$	a CH_2 csoportok szimmetrikus nyújtási rezgése
DMPC	dimirisztoil foszfatidil-kolin
DOPC	dioleoil foszfatidil-kolin
DPPC	dipalmitoil foszfatidil-kolin
DSPC	disztearil foszfatidil-kolin
PSS	poli-(nátrium 4-sztirénszulfonát) (<i>negatív töltésű polielektrolit</i>)
SVD	szinguláris érték felbontás (Singular Value Decomposition)
[Sx]	a dolgozat alapjául szolgáló saját közlemény – külön jegyzékben a dolgozat végén
(x:y)	a (x = zsírsavláncban levő szénatomok : y = a kettős kötések) száma

ELŐSZÓ

A biológiai rendszerek a folyamatos mozgás, változás révén a bizonyos idő-, tér- és hőmérséklettartományban fenntartott állandóságot jelentik. Lényegük a mozgás, nemcsak makroszkópikus szinten, hanem elemi építőköveik, a molekulák szintjén, sőt még az alatti szinteken is. A rendkívül komplikált életfolyamatok szervezését a természet úgy oldja meg, hogy a környezeti hőmérséklet által meghatározott termikus energiaszint fölött nem sokkal magasabban elhelyezkedő kölcsönhatások (hidrofób kölcsönhatások, hidrogén hidak, elektrosztatikus kölcsönhatások) egyenként kis energiát követelő elemi lépéseiből kialakított óriási, sok ponton vezérelhető hálózatokat hoz létre. A hálózatok összehangolt működését, ami végül az élőlényt teszi, az élő anyagban levő információ szervezi meg.

Ennek a változatosság $\leftrightarrow$ állandóság problémának a megoldását, megértését az emberek nagyon régen, és igen különböző szinteken (vallások, filozófia, természettudományok) keresik.

A természettudományos kutatás tekintetében ez az általános kép azt jelenti, hogy a biológiai rendszerek széles tartományban dinamikusak, a dinamika nemcsak egyes molekuláik belső szerkezetét, hanem a molekulák kölcsönhatását is érinti. Jelen értekezésben a biológia által kínált nagyon sok példa közül a biológiai membránok szintjén, a lipidekben, a fehérjékben, és a lipid-fehérje kölcsönhatásokban megjelenő dinamikával, ennek a dinamikának a membrán szerkezetére és funkciójára gyakorolt hatásával foglalkozom.

Azt tudjuk, hogy minden biológiai működés csak egy adott hőmérséklettartományban lehetséges, ami megszabja nemcsak az egyes molekulák, hanem az olyan összetett rendszerek, mint pl. a biológiai membrán létét is. Az egyes molekulák, illetve szerkezeti vagy funkcionális molekulacsoportjaik dinamikája sokféleképpen befolyásolja a hozzájuk kapcsolódó életfolyamatokat. Úgy tűnik, hogy a membrándinamika megváltozása a fiziológiai hőmérséklettartomány alsó és felső határánál is az életfolyamatok fenntartásának korlátja lehet. Azaz, ha egy

biológiai szervezetet fiziológiai hőmérsékleti határaihoz vagy azon túl kényszerítünk, akkor membránjainak működése, sőt léte is veszélybe kerül.

Ezekkel a jelenségekkel kapcsolatban rengeteg kérdés vetődik fel: Mely membránösszetevők és milyen mértékben felelősek a membránszerkezet/funkció károsodásáért/megszűnéséért? A fehérjék? A lipidek? (Hogy csak a fő membránalkotókat említsük.) Esetleg a köztük levő kölcsönhatás megváltozása? Adnak-e a membránok figyelmeztető jeleket a szervezet számára, valamilyen védekezési mechanizmus bekapcsolására extrém körülmények között? Ha igen, mi a jel forrása?

Hogyan lehet egy ilyen problémahalmazt megközelíteni? Én a sok lehetséges módszer közül az infravörös spektroszkópiát¹ választottam, ami olyan energiákkal operál, mint amelyek a biológiai makromolekulák szerkezetváltozásainak elemi lépéseiben játszanak szerepet. Ezen kívül az infravörös spektroszkópia egyszerre képes információt adni a membránok lipidjeiről és fehérjeiről, róluk olyan paramétereket szolgáltat, amelyek többnyire igen jó korrelációban vannak dinamikájukkal. A lipidekről a zsírsavláncok konformációs rendezetlenségének, a fehérjékről a másodlagos szerkezet feltárásának révén tudósít. Sőt, a membránfehérjék H→D kicserélődésének mérése révén, direkt membrándinamikai vizsgálatokat is lehetővé tesz.

A vizsgálatokhoz olyan biológiai rendszereket választottam, amelyek genetikai módszerekkel megváltoztathatóak, és így szelektíven tudtuk a számunkra érdekes összetevőket befolyásolni. A vizsgált objektumok cianobaktériumok tilakoid és citoplazma membránjai voltak, ahol a zsírsavak telítetlenségét tudtuk kívánságunk

¹ Rezgési spektroszkópiai kutatásaim a 70-es évek közepén indultak a Szegedi Biológiai Központ Biofizikai Intézetében. Kandidátusi fokozatom megszerzése (1984) után az SZBK Növényélettani Intézetének kutatóival együttműködve a cianobaktériumok fénybegyűjtő rendszerének fehérjéivel, a fikobiliproteinekkal kezdtünk el foglalkozni. Mi voltunk az elsők, akik használható rezonancia Raman spektrumot közöltünk ezekről a fehérjékről, később a $^{14}\text{N} \rightarrow ^{15}\text{N}$ izotópcsere kihasználásával teljes asszignációját is adtuk a fikobiliprotein kromofórok, a fikocianobilin és a fikoeritobilin rezonancia Raman spektrumának. Így aztán többször meghívott előadója is voltam az ezzel a témával foglalkozó konferenciáknak, szimpóziумoknak. Anyagi lehetőségeink azonban nem tudtak lépést tartani a téma fejlődésével, ezért 1993-94-ben az olcsóbb „testvér”, az infravörös spektroszkópia felé fordultunk. Így a dolgozatban kandidátusi fokozatom megszerzése óta készült közleményeim közül nyolcnak a felhasználásával, és kisebb részben a téma kifejtését teljesebbé tevő, máshol még nem publikált, legújabb eredményeim hozzáadásával a biológiai membránokon végzett infravörös spektroszkópiai munkásságomat fogom összefoglalni.

szerint megváltoztatni, továbbá a dohány, aminek tilakoid membránjában a foszfatidilglicerol zsírsavösszetételét változtathattuk meg. Az, hogy a vizsgált membránok fotoszintetikus membránok voltak, alkalmat adott néhány, a fotoszintézissel kapcsolatos probléma tisztázására is, de egyébként csak modellként tekintem őket egy általánosabb probléma vizsgálatában.

A kérdés, amire szándékaim szerint az egész dolgozatban a választ keresem, a klasszikus „mi volt előbb, a tyúk, vagy a tojás” problémához hasonlít, nevezetesen: **„Minek van elsődleges szerepe a membránok dinamikájának alakításában, a fehérjéknek, vagy a lipideknek?”**

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A biológiai membránok

A tudományos értekezések általában azzal kezdődnek, hogy a szerző kijelenti, hogy az általa tanulmányozott kérdés az adott tudományág egyik alapvető problémája, annak vizsgálata tehát időszerű és fontos. Szerencsés helyzetben vagyok, mert a biológiai membránok a biológia tekintetében ennek a feltételnek mindenképpen megfelelnek, hiszen, hogy mást ne mondjunk, vannak olyan definíciók, amelyek „Az élő állapot”-ot² a környezettől való elhatárolódással, illetve a környezettel folytatott anyagcserével jellemzik. Ezt a két funkciót pedig éppen a biológiai membránok egyesítik magukban. Ennek megfelelően azután a biológiai membránok (a továbbiakban: membránok) kutatása nagyon sok területet ölel fel, amiből még egy-egy területnek is csak kis részét tűzheti ki vizsgálódása tárgyául egy-egy kutató. A membránok komplikált kémiai összetétele, funkcionális sokszínűsége miatt még egy leszűkített téma estében is szoros együttműködésre van szükség vegyészek, biológusok, fizikusok között. Fizikus lévén, az értekezésben bemutatandó munkákban, a biológiai minták előállításában, biokémiai jellemzésében nagymértékben kellett, hogy támaszkodjam kollégáim ismereteire, segítségére. E tekintetben a Szegedi Biológiai Központ egyik alapító gondolata, az interdiszciplináris kutatások lehetővé tétele³, igen jól működött. A Szegedi Biológiai Központ Növénybiológiai Intézetének munkatársaival⁴ fenntartott immár 25 éves együttműködésem volt a „biológiai alapja” az értekezésben szereplő munkáknak is. Az egyes esetekben eltérő más partnerek majd kiderülnek az idézett közleményekből.

² Hommage à Szent-Györgyi Albert

³ Elsősorban Straub F. Bruno-nak köszönhetően.

⁴ Itt ki szeretném emelni Gombos Zoltánt, aki a cianobaktériumokon való együtt munkálkodásunk kezdeményezője volt, és akitől nagyon sokat tanultam a cianobaktériumok fiziológiáját és a „lipidológiát” illetően.

Engem a biológiai membránok tekintetében főleg a szerkezeti, dinamikai vonatkozások érdekeltek. Egyrészt, hogy hogyan lehet megismerni a lipidek⁵ membránbeli szerkezetét, ennek a szerkezetnek a dinamikáját, másrészt hogyan lehet felderíteni a membránfehérjék ugyanezen tulajdonságait, harmadrészt, hogyan hatnak kölcsön a lipidek a membránfehérjékkel, és ebben a kölcsönhatásban mi a szerepe az egyes komponensek szerkezetének, dinamikájának.

Ahogy ma a biológiai membránokat elképzeljük, amilyen irányokban vizsgálódunk, azt döntően a Singer és Nicholson által 1972-ben felvázolt „Fluid mosaic” membrán modell határozza meg [\(1\)](#). Ez a modell, leegyszerűsítve, azt mondja, hogy a biológiai membránok lipid kettősrétegekből állnak, amelyek poláros fejcsoportjai kétfelől a vizes fázissal vannak kapcsolatban, és a membrán belsejében vannak a „fluid”⁶ állapotú hidrofób zsírsavláncok. Ebben a kétdimenziós lipid „tengerben” úsznak a membránfehérjék, amelyek úgy vannak a membránba beágyazva, hogy transzmembrán részeik hidrofóbok, a membránból kiálló részeik, legalábbis a felszínükön, hidrofilek. Eredeti megfogalmazása óta, persze, ez a kép sokat finomodott [\(2\)](#), ma másként gondolkodunk például a lipidek membránbeli gyors laterális diffúziójáról, amit az eredeti modell feltételezett, magukról a membránalkotó lipidekről is, például a lipid „tutajok” (rafts) [\(3\)](#) ideájának felmerülése óta, vagy hogy tudjuk, vannak olyan lipidek, amelyek önmagukban nem lennének képesek kettősréteg kialakítására.

Vizsgálataimat jórészt megszabta, hogy módszerként az infravörös spektroszkópiát használtam, ami kiváló eszköznek bizonyult, de menet közben magát a metodikát is folyamatosan fejleszteni kellett, hogy az információt, amit a módszer elvben biztosan nyújt, ki is nyerhessük, és az eredményeket megfelelően megmagyarázhassuk. Az alábbiakban ezért elsősorban az infravörös spektroszkópia szemszögéből, annak lehetőségeinek figyelembe vételével igyekszem felrajzolni azt a képet, amit a membránok mutattak, amikor elkezdtük vizsgálatainkat, és jelzem

⁵ A kémiai nevek tekintetében, ahol csak lehetséges, az Elődi Pál iránti tiszteletből (akinek csoportjában kezdtem el dolgozni diákkörösként), az általa írt Biokémia könyvet követem.

⁶ A „fluid” kifejezés, lévén, hogy egy makroszkópikus paraméterre vonatkozik, bár általánosan használatos, a biológiai membránokra alkalmazva nem egészen pontos. A dolgozatban később majd kitérek használatának korlátira.

majd azokat a pontokat, ahol a mi kutatásaink a korábbiakhoz csatlakoznak. A membrán fő alkotóit, a lipideket és a fehérjéket először külön-külön tárgyalom, azután térek át az egész membrán szerkezetére vonatkozó vizsgálatokra.

LIPIDEK

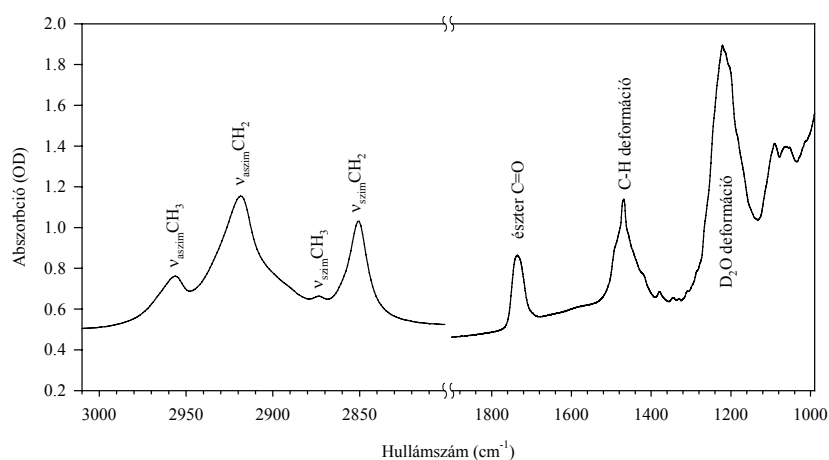
Ami a rezgési spektroszkópiát illeti, a lipidek kettősrétegbeli szerkezetét kezdetben Raman spektroszkópiával vizsgálták, még hozzá modell membránokban, kihasználva, hogy az ilyen minták nem nyelik el a gerjesztő (általában Ar^+ , vagy Kr^+) lézer fényét a kék-zöld tartományban. Bevezettek egy laterális rendparamétert, a $3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$ közötti C-H rezgési tartományt felhasználva és egy tranzverzális rendparamétert, az $1200\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ közötti C-C rezgési tartományra alapozva (4), amelyekkel jól le lehetett írni a lipid zsírsavláncok rendezetlenségének mértékét, illetve a rendezetlenség megváltozását, pl. hőmérsékletváltozás, vagy valamilyen, a membrán szerkezetét befolyásoló anyag hatására (5)⁷.

A lipidek infravörös spektroszkópiája

A 70-es évek végén, a 80-as évek elején, a Fourier transzformációs infravörös (a továbbiakban: FTIR) spektroszkópia fokozatosan kiszorította a Raman spektroszkópiát mind a modell lipid, mind a biológiai membránok vizsgálatának területéről. Az infravörös spektrumban a C-H rezgések, a csoport aszimmetriája miatt, erősebbek, a C-C rezgések pedig szintén szimmetria okokból, gyengébbek, mint a Raman spektrumban. Illusztrálásul bemutatom a dipalmitoil foszfatidil-kolin (DPPC) infravörös spektrumát.

Manapság az infravörös spektroszkópia egy jól kipróbált, megbízható módszer, mind modell (6), mind biológiai membránok (7;8) jellemzésére. Az infravörös spektroszkópia előnyei között e tekintetben meg kell említenünk azt,

⁷ Félkövéren jelzem azokat a hivatkozásokat, amik saját, de a dolgozatban részletesen nem tárgyalt munkákra vonatkoznak.



1. ábra: A DPPC infravörös spektruma D_2O -ban. A CH rezgési tartomány és az észter $C=O$ rezgés lesz az, amivel a dolgozatban részletesen foglalkozom.

- hogy az infravörös spektrumban együtt vannak a lipidekre, illetve a fehérjékre jellemző, de egymástól jól elkülönült tartományok, így egyszerre tanulmányozható a két membránkomponens külön-külön, és kölcsönhatásaik is,
- hogy lehetőség van kívülről bevitt, izotóppal jelölt, de egyébként a rendszerben meglevő, azokkal kémiai azonos molekulák vizsgálatára (9),
- sőt arra is, hogy *in situ* jelöljük izotóppal lipid molekulákat (10)

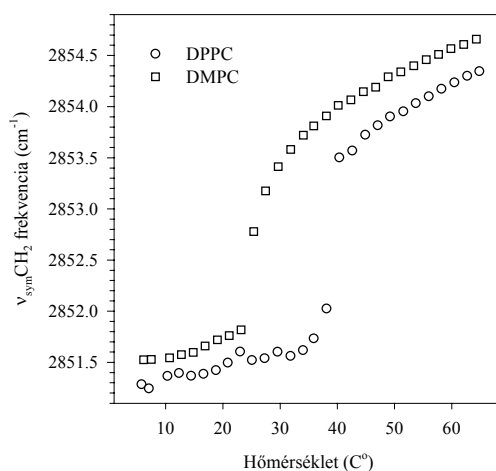
A lipidek fázis állapotára, konformációjára jellemző paraméterek az infravörös spektrumban:

CH₂ bólogató rezgés eloszlás (wagging progression)

Van a lipidek infravörös spektrumában egy olyan tartomány, ami közvetlenül meg tudja mutatni, hogy hány „törés”, a szabályosan pakolt *transz* lánc konformációtól való eltérés, van a zsírsavláncokban (11). Ez a tartomány a C-H rezgések deformációs rezgéseivel kapcsolódik. Úgy találták ugyanis, hogy az egyes CH₂ szegmensek deformációs rezgései csatolódnak egymáshoz, mégpedig attól függően, hogy milyen hosszú a *transz* szakasz a láncban. Ezt a csatolást megtörik a *gauche* szegmensek, ezért a CH₂ bólogató rezgések 1180-1340 cm⁻¹ között egy sáv sorozatot adnak (CH₂ wagging progression), a sorozat egyes elemeinek intenzitásából kiszámítható, zsírsavlánconként átlagosan hány *gauche* szegmens van a membránlipideken. Például, a DPPC folyadékkristályos (L-α) állapotában zsírsavlánconként 3.6-4.2 *gauche* szegmens van, ha koleszterolt adunk a modell membránhoz, akkor a *gauche*-ok száma lecsökken nagyjából 1-re (12). A probléma csak az, hogy ezek a deformációs rezgések elég gyengék. Ahhoz, hogy értékelhetően lássuk őket, olyan vastag mintát kell használni, hogy egy biológiai membrán esetében a fehérjék abszorpciójánál már telítésbe menne a spektrométer (7), és így elvesztenénk az infravörös spektroszkópia egyik fő vonzerejét a lipid-fehérje kölcsönhatások vizsgálatában, nevezetesen, hogy egy mintán, ugyanabban méréseben vizsgálhatjuk mindkét membránalkotó viselkedését. Azért a CH₂ bólogató rezgés ilyen hasznosításáról nem mondtunk le teljesen, de az értekezésben szereplő valamennyi munkában a CH₂ nyújtási rezgéseket használtam a lipidek állapotának jellemzésére, és ennek a tartománynak az analízisét igyekeztem olyan irányban fejleszteni, hogy tudósítson a *transz* és *gauche* rotamerek arányának esetleges megváltozásáról.

C-H nyújtási rezgések

Modell rendszerben széles körben használják az infravörös spektroszkópiát a foszfolipid kettősrétegekben a lipid zsírsavlánckok rendezettségének/rendezetlenségének vizsgálatára (13). E tekintetben a leginkább használt spektroszkópai paraméter a CH_2 csoportok szimmetrikus nyújtási rezgése ($\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$) 2850 cm^{-1} körül ([1. ábra](#)). Ennek a rezgésnek a frekvenciája $2\text{--}5\text{ cm}^{-1}$ -t tolódik el a magasabb frekvenciák felé a gél→folyadékkristály fázisátmenet során. A $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ frekvencia hőmérsékletfüggése nagyon érzékeny mutatója a lipid zsírsavlánckok konformációjának (14).



2. ábra: A dipalmitoil és a dimirisztoil foszfatidilkolin (DPPC és DMPC) $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ frekvenciájának (lásd [1. ábra](#)) hőmérsékletfüggése. Szembetűnő, hogy a mirisztinhez képest a palmitinsavban levő kettővel több szénatomnak milyen nagy hatása van a gél-folyadékkristályos fázisátmenet hőmérsékletére. A DPPC esetében a palmitinsav hosszabb láncai miatt vastagabb hidrofób réteg megbontásához majdnem 20 C° -kal magasabb hőmérsékletre⁸ van szükség, mint a DMPC-nél.

Ennek illusztrálására bemutatok két lipid, a dipalmitoil és a dimirisztoil foszfatidil-kolin $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ frekvenciájának hőmérsékletfüggését ([2. ábra](#)). Az ábrán jól látszik, hogy a lipid fázisátmenet mennyire érzékeny, pl. a zsírsavlánckok hosszára. A DPPC kettősréteg 16 szénatomot tartalmazó palmitinsav láncokból álló vastagabb

⁸ Nehogy becsapódjunk, ez a 20 C° foknyi különbség csak körülbelül 7%-os energia növekménynek felel meg!

hidrofób rétegének megbontásához majdnem 20 °C-kal magasabb hőmérséklet kell, mint a 14 szénatomból álló mirisztinsav kettősrétegéhez. A zsírsavláncok hosszán kívül, a $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ sáv frekvenciájának hőmérsékletfüggése nagyon függ a membrán egyéb paramétereitől, pl. a lipid- és a zsírsavösszetételtől, a lipidek és a fehérjék közti kölcsönhatásoktól (15). A [2. ábrán](#) látszik, hogy, a $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ eltolódásának leírásához a frekvenciát nagy pontossággal kell meghatározni. A frekvencia meghatározása kezdetben a csúcs közvetlen környezetében illesztett polinomokkal történt, vagy a sáv súlypontjának meghatározásával (16). Tudtommal mi voltunk az elsők, akik az infravörös spektroszkópia elméletének megfelelően, Lorentz görbével illesztettük a $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ sávot (10). A bemutatott görbéken a pontosság körülbelül 0.1 cm^{-1} .

Egy másik diagnosztikai értékű paraméter a $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ sáv szélessége, ami jelentősen megnő a gél→folyadékkristály fázisátmenet során (17). Kiderült azonban, hogy a $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ frekvencia eltolódásának, illetve sáv szélesség növekedésének hőmérsékletfüggése nem azonos sem biológiai (18;19), sem modell membránokban (20). Az eltérő hőmérsékletfüggés abban nyilvánul meg, hogy gél→folyadékkristály átmenet során a sáv szélesség növekedése lényegesen alacsonyabb hőmérsékleten indul be, mint a frekvencia eltolódása.

A jelenséget azzal próbálták magyarázni, hogy a sáv szélesség, illetve a frekvencia változása a lipid rendezetlenség és mobilitás más-más aspektusához kötődik (19;21). Ezt a magyarázatot meglehetősen kétségesnek találtam, a jelenség mélyebb megértésének vágya vezetett a $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ rezgés, jelen értekezésben is tárgyalt, részletesebb vizsgálatához. A lipid megolvadás jelenségének megértésében nagyon fontos lépést jelentettek Dluhy és munkatársainak vizsgálatai (20;22). Ők egy kétállapotú modellt fejlesztettek ki két lipidből álló rendszerek viszonyainak leírására. A két állapot a gél, illetve a folyadékkristályos állapot volt, meghatározták az ezekre a tiszta állapotokra extrapolált infravörös spektrumokat, és a köztes állapotokat a két „tiszta” spektrum megfelelő összekeverésével előállítva, kvantitatívan le tudták írni az olvadás folyamatát.

Az izotóp-helyettesítés lehetőségei membrán lipidek tekintetében:

A membránok szerkezetének vizsgálatában izotópként eddig tudtommal csak a deutérium szerepelt, érthetően, hiszen a deutérium adja a legnagyobb izotóp effektust (a kétszeres tömeg következtében egy tisztán H/D atomot tartalmazó rezgési módus frekvenciája X-H kötés esetében harmonikus közelítés esetén $\sqrt{2 \frac{m_X + m_H}{m_X + m_D}}$ -ére csökkenne - ahol m az illető atom tömege). A valóságban ehhez az értékhez igen közel is van a C-H/C-D rezgések frekvenciájának aránya.

Kívülről bevitt molekulák alkalmazása

A mindig többféle lipidet tartalmazó biológiai membránokban az infravörös spektroszkópiával elérhető szelektivitás lehetőségét adhatja, ha olyan lipideket használunk, amelyek zsírsavláncaiban a hidrogén atomokat deutériumokra cserélték ki. Ez a gyakorlatban azt jelenti, hogy perdeuterált, vagy előre meghatározott helyeken deuterált lipidekkel építenek fel modellrendszereket (23-27), vagy olyan biológiai rendszereket vizsgálnak, mint pl. a vörösvértestek, amelyek képesek felvenni kívülről adott lipideket (9;28).

***In situ* deuterálás**

A lipidek deuterálásának egészen új lehetősége merült fel annak az eredeti megközelítésnek a nyomán, ami Joó Ferenc és Vigh László nevéhez fűződik, akik vízben oldódó katalizátorok alkalmazásával *in situ* telítették a lipidek zsírsavláncainak kettős kötéseit modell, illetve biológiai membránokban (29)⁹. Azaz,

⁹ Ez a megközelítés eredetileg arra szolgált, hogy felderítsék, milyen közvetlen szerepe lehet a lipidek kettős kötés tartalmától függő membrán fluiditásnak a növényi sejtek hőmérsékletadaptációjában. Ez a probléma szorosan kapcsolódik az ún. homeoviszkozus adaptáció fogalmához, amire még később visszatérek.

az eredetileg meglévő --HC=CH-- szegmensek helyett --HCH--HCH-- szegmenseket hoztak létre.

Az alapelgondolást, spektroszkópus lévén, kiterjesztettem azzal, hogy használjuk ki a deutérium infravörös spektrumok tekintetében óriási izotóp effektusát, és végezzük deutériummal a katalizátoros kísérleteket. Eszerint, az eredetileg meglévő --HC=CH-- szegmensek helyett, szándékunk szerint, --HCD--HCD-- szegmenseket alakítottunk volna ki¹⁰. Ilyen módon „tökéletes” jelölt molekulához juthatunk, amely kémiaiilag megegyezik a többi molekulával, de infravörös spektruma C-D rezgéseket tartalmaz, amik a $2800\text{--}3050\text{ cm}^{-1}$ közötti C-H rezgésektől teljesen elkülönülten, $2050\text{--}2200\text{ cm}^{-1}$ körül jelentkeznek.

Ez az elgondolás be is vált, először modell rendszeren **(31)**, majd szarkoplazmatikus retikulum membránokon mutattuk be **(10)**, hogy lehetséges olyan deutérium jelölést kialakítani a membránokban, ami infravörös spektroszkópiával jól detektálható, és hogy a deutériummal megjelölt molekulák viselkedéséből a membrán szerkezetét, a fehérje-lipid kölcsönhatásokat érintő következtetések vonhatók le. A katalitikus reakció leállításával nyerhető, deutériummal részlegesen telített, eredetileg telítetlen zsírsavak alkalmazásában az az ötlet, hogy kettős információhoz jutunk: (i) A minden zsírsavláncon meglévő CH_2 csoportok vizsgálatából megtudjuk, milyen a zsírsavak átlagos rendezetlensége a rendszerben. (ii) Mivel a deutérium jelölés csak az eredetileg telítetlen 9, 12, 15-ös pozíciókban lehetséges, a H-C-D csoportokkal olyan szerkezeti próbákhoz jutunk, amik a membránnak csak egy bizonyos mélységéből tudósítanak. Ezen kívül azzal, hogy telítettünk bizonyos zsírsavakat, egy olyan populációt hoztunk létre, amelynek viselkedése egészen eltérő lehet a nem érintett lipidekétől.

Ezeket az eredményeinket nem fogom részletesen megtárgyalni a dolgozatban, majd csak arra a megfigyelésre fogok kitérni, miszerint dioleil foszfatidil-kolin (DOPC) deutériummal való fokozatos telítésekor a kapott, egyre növekvő mértékben

¹⁰ Az infravörös spektroszkópiai mérések tanúsága szerint azonban mindig jelentős mennyiségű --DCD--DCD-- szegmens is keletkezett. A nem várt CD_2 csoportok eredetének felderítése az egész katalizátor család addig gondolt működési mechanizmusának felülvizsgálatához vezetett. Erről szóló cikkünket **(30)** nem tárgyalom az értekezésben.

telített, azaz egyre több stearinsavat (S) tartalmazó DOPC/OSPC/SOPC/DSPC keverékekben a $\nu(\text{C-D})$ rezgés frekvenciája nem függött a telítettség mértékétől, a $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ frekvenciája viszont csökkent, ahogy a telített zsírsavak aránya nőtt. Ez a látszólagos ellentmondás lett egyik kísérleti alapja a $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ rezgések részletes vizsgálatának, amit részletesen bemutatok a későbbiekben.

***In vivo* deutérium jelölések**

Egyes esetekben megvan a lehetősége annak, hogy az egész organizmust deuterált környezetben neveljék fel, mint például az *E.coli*-nál¹¹, vagy a cianobaktériumoknál. A cianobaktériumok esetében a múlt század 60-as éveiben Katz és munkatársai foglalkoztak cianobaktériumok D_2O -ban való felnevelésével, őket a normális, illetve deuterált fehérjék szerkezeti stabilitása közti különbség érdekelte (32). Összesen négyféle lehetőség adódott: (i) normál fehérjék vízben, (ii) normál fehérjék nehézvízben, (iii) deuterált fehérjék vízben és (iv) deuterált fehérjék nehézvízben¹².

Az derült ki, hogy a legstabilabbak a normál fehérjék deuterált környezetben, azután a normál fehérjék normál környezetben, a deuterált fehérjék deuterált környezetben és végül a deuterált fehérjék normál környezetben. A jelenségnek az a magyarázata, hogy a kicserélődő, illetve a nem kicserélődő H/D atomoknak eltérő hatása van a fehérje stabilitására.

Egy normál fehérje normál környezetben optimális szerkezetűnek tekinthető. Ha a fehérje nehézvízbe való tételével a hidrogén hidakat kicseréljük deutérium hidakra, akkor a deutérium kétszeres tömege miatt általában megnő a hidrogénhidak kötési energiája. Ellenben, ha egy deutériumos környezetben nevelt fehérjét tekintünk, ahol

¹¹ Az *E.coli*-t legtöbbször azért nevelik deutériumos környezetben, hogy deuterált fehérjéket állítsanak elő, leginkább neutron diffrakciós kísérletek számára, például a riboszóma szerkezetének felderítéséhez, ahol a riboszóma egyes fehérje komponenseit deuteráltakra kicserélve a szerkezet fokozatosan felderíthető.

¹² Itt meg kell említeni, hogy a H/D atomok viselkedése nagyon függ attól, milyen atomhoz kötődnek. Ha olyan atomhoz kötődnek, amelyik képes hidrogén híd kialakítására (O, N, és valamelyest a S is), akkor ezek a H/D atomok ki tudnak cserélődni környezetük (leggyakrabban a H_2O vagy D_2O) H/D atomjaival. Azok a H/D atomok azonban, amelyek például szénatomhoz kötődnek, nem cserélődnek ki. Ezért volt érdekes a kétféle fehérjénél mind a kétféle oldószer használata.

az aminosav oldalláncok CH_2 , CH_3 és aromás CH csoportjaiban mindenhol D atomok lesznek, akkor ezek a cserék érintik a fehérje szerkezetét, mert a deutérium nagyobb tömege miatt, a C-D kötés térkitöltése 2-3%-kal kisebb lesz, mint a C-H kötésé, ezért az ilyen fehérje szerkezetek stabilitása lecsökken. Ezt a stabilitáscsökkenést némiképp ellensúlyozni tudja a D-hidak nagyobb kötési energiája, ezért stabilabb egy D-fehérje deutériumos környezetben, mint a normálban.

A fehérjék másodlagos szerkezetét tekintve azonban kiderült, hogy az gyakorlatilag azonos a normál és a deuterio-fehérjékben, mint azt korábban immunológiai módszerekkel (33), és mostanában a másodlagos szerkezet részletekbe menő infravörös spektroszkópiai vizsgálatával is kimutatták (34).

A deuterálásnak ezt az aspektusát azért tárgyaltam ilyen részletesen, mert ez adta az alapötletet egy kísérletünkhöz, amit még erőforrások hiánya (drága a D_2O) miatt nem tudtunk teljesen befejezni (de a közeli jövőben remélem, hogy igen). Ezt a munkát nem ismertetem részletesen az eredményeknél, itt röviden azért térek ki rá, hogy lehetőleg teljes legyen a kép az izotóphelyettesítés lehetőségeiről és ígéretes képességeiről.

Az általunk elvégzett kísérlet (amihez hasonló tudtommal eddig senki nem csinált) lényege, hogy cianobaktérium sejteket neveltünk egyre növekvő mértékben deuterált tápoldatokban, és mindig megmértük membrán lipidjeik zsírsavláncainak rendezetlenségét a hőmérséklet függvényében. Ebben a kísérletben az az érdekes, hogy a C-D csoportok kisebb térkitöltése, mint fentebb említettem, okoz ugyan stabilitás csökkenést a fehérjékben, de a fehérjék szerkezete, mivel azt a változatlanul maradó peptidkötések határozzák meg, nem változik. Nem így a lipidek esetében. Itt a kisebb C-D térkitöltés miatt a zsírsavláncok egymáshoz közelebb helyezkedhetnek el, irányonként 2-3 %-kal sűrűbben. A membrán két dimenzióját figyelembe véve ez már jelentős összetömörödést jelent. A szorosabban pakolt zsírsavláncok „hidegebb”, rendezettebb membránokat kellene, hogy adjanak, ugyanazokon a hőmérsékleteken, mint a normális zsírsavláncok.

Eddigi eredményeink azt mutatják, hogy a várakozással ellentétben, a $\nu(\text{C-D})$ rezgéseket nézve az infravörös spektrumban, nem változik meg a

membrándinamika¹³ hőmérsékletfüggése a deuterált membránokban a normális membránokéhoz képest. A deuteráció szintjének fokozásával egy darabig láthatunk C-H és C-D rezgéseket is, ezek hőmérsékletfüggése is egyformának adódott¹⁴. A legmeglepőbb eredményt a deuterált membránok zsírsavösszetételének analízise szolgáltatta, ami szerint a deutériumos környezetben nevelt sejtek membránjaiban a zsírsavláncok lényegesen rövidebbek, mint a normál sejtekben, még az sem kizárt, hogy elágazó láncokat tartalmaznak, ennek tisztázására még további kísérleteket kell végeznünk¹⁵. Azaz, úgy tűnik, hogy a sejtek mindenre készek, hogy biztosítsák az adott hőmérsékleten a sejt elhatárolásához, az anyagcseréhez, a membránfehérjék működéséhez megkívánt membrándinamikát.

FEHÉRJÉK

A lipidek mellett a membránok másik fő alkotóelemei a fehérjék, amelyekhez a membránfunkciók nagyrészt köthetőek. A membránfehérjék, eltérő aminosav szekvenciájuk miatt, lényegesen különböznek vízben oldódó társaiktól, és sajnos ezek a különbségek szinte kivétel nélkül, a velük való bánás során a nagyobb technikai nehézségek irányába hatnak. A membránfehérjék kémiai természete, másodlagos szerkezetének elemei természetesen azonosak a vízben oldódó fehérjékével, de ezen tulajdonságoknak a membránfehérjén belüli eloszlása az, ami vízben oldódókétól különbözik. A membránfehérjéket nagyon nehéz vizes oldatban tartani, felszínük legnagyobb részét hidrofób aminosav oldalláncok borítják, ezért oldatba vitelükhöz segédanyagokra, rendszerint valamilyen detergensre van szükség.

¹³ A lipidek infravörös spektroszkópiájában tulajdonképpen nem a molekulák dinamikáját, hanem a lipidek konformáció eloszlását mérjük meg, ami azonban legtöbbször szoros korrelációt mutat a zsírsavláncok dinamikájával. Az infravörös spektrumokban a $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ rezgés sávjának, fölfele tolódásával lehet jellemezni a zsírsavláncok növekvő rendezetlenségét, azaz többnyire magasabb dinamikáját, mint azt a **2. ábrán** megmutattam.

¹⁴ Amikor a deuteráció szintje már igen magas (>90%), akkor a megmaradó gyenge C-H rezgésből származó sáv hőmérsékletfüggése más, mint a C-D rezgések hőmérsékletfüggése. Ez még igen csak előzetes eredmény, de mintha arra utalna, hogy a sejt valamilyen izotóp preferenciát érvényesít bizonyos esetekben.

¹⁵ Itt is érzem Farkas Tibor fájdalmas hiányát, váratlan halála megszakította együttműködésünket e téren is, nem beszélve bölcs tanácsairól, személyiségéről.

Másodlagos szerkezetükben általában az α -hélixek dominálnak, amelyek transzmembrán szegmensekbe rendeződnek, a vizes fázisba kinyúló részeik rendszerint rendezetlenek, vagy β -szerkezetűek. Vannak azonban olyan membránfehérjék is, amelyek úgynevezett β -hordó szerkezetbe rendeződnek, és többnyire a membránon keresztüli transzportban vesznek részt (például a mitokondriális fehérje transzportban (35)).

A fehérjék infravörös spektroszkópiája

Az infravörös spektroszkópia tekintetében nem kell különbséget tennünk a vízben oldódó és a membránfehérjék között, spektroszkópiailag a feladat és a problémák azonosak, a különbségek a mérések technikai megoldásában, a minták előkészítésében és kezelésében vannak.

Azt, hogy az infravörös spektroszkópiát a fehérjék másodlagos szerkezetének leírására lehet felhasználni, elsősorban az teszi lehetővé, hogy az aminosavak halmazából a fehérjét kialakító peptidkötésekben levő C=O csoportok gyakorlatilag mind hidrogén hidakat képeznek, és a $\nu(\text{C=O})$ frekvencia függ attól, hogy milyen annak a hidrogén hídnak az erőssége, aminek az adott peptidkötés O atomja az egyik pillére. Ezeknek a rezgéseknek az összessége adja az amid I tartományt, ami $1700\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$ között helyezkedik el.

Másodsorban azért lehetséges, leginkább a fehérje saját dinamikájának vizsgálata infravörös spektroszkópiával, mert a peptidkötés N-H csoportjai, amelyek a C=O csoportoknál említett hidrogén hidak másik felét adják, nagyon érzékenyek a $\text{H} \leftrightarrow \text{D}$ izotópcserére. A $\delta(\text{N-H})$ frekvencia, ami 1550 cm^{-1} körül van, nagyjából 1450 cm^{-1} -re tolódik a $\delta(\text{N-D})$ esetében. Ezek a rezgések adják az amid II, illetve az amid II' sávokat¹⁶. A peptidkötések karakterisztikus rezgési frekvenciáit és azok asszignációját jól összefoglalja Arrondo egy 1993-as közleményében (36).

¹⁶ Deuterált csoportok esetében az amid sávokat I' és II' jellel jelöljük.

Természetesen, amit itt felvázoltam, az egy durván leegyszerűsített kép, de könnyen megjegyezhető, és azért fedi a lényegét is. A peptidkötés rezgési módusai jóval összetettebbek, az amid I sáv rezgéseiben is van csatolt N-H deformáció, az amid II sávban is van csatolt C=O rezgés, de a fentebb, az egyes sávok jellemzésére megadott rezgések adják a legnagyobb hozzájárulást az adott módushoz.

A peptidkötés lehetséges módusainak megfelelően természetesen vannak további amid sávok is, de azok témánk szempontjából most érdektelenek.

A fehérje spektrumok felvétele

Ahhoz, hogy a fehérjék szerkezetéről az infravörös spektrum analízisével bármit is mondhassunk, néha bizony eléggé nehezen teljesíthető feltétel egy megfelelő minőségű spektrum felvétele, illetve annak megállapítása, hogy a felvett spektrum mennyiben mutatja a fehérjét, illetve mennyiben a minta egyéb összetevőit.

Ha a fehérjét vizes rendszerben mérjük, akkor a legnagyobb nehézséget a víz 1643 cm^{-1} táján levő rendkívül intenzív deformációs rezgése okozza, ami elfedi az amid sáv legnagyobb részét. A víz hozzájárulásának levonására azt a módszert szokták alkalmazni, hogy felveszik tiszta víz, vagy a mintában használt puffer spektrumát. Ezután ezt a spektrumot addig vonják le a minta spektrumából, amíg a $2300\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$ tartományban egyenes alapvonalat nem kapnak. Ekkor úgy tekintik, hogy az amid I régióban is tökéletesen levonták a víz hozzájárulását. Szerintem ez a megoldás csak olyan esetekben fogadható el, amikor a fehérje spektrumnak valami többé-kevésbé durva közelítése is megfelelő.

A vízlevonás fentebbi módszere ugyanis több sebből vérzik, amely sebek nem is nagyon gyógyíthatóak:

Az egyik baj az, hogy a $2300\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$ tartományon, a minta alapvonala általunk általában pontosan nem meghatározható okokból változhat. Mivel az 1643 cm^{-1} -es víz deformációs rezgés sokkal intenzívebb a 2200 cm^{-1} körüli kombinációs sávnál, amit a víz levonására használunk, egészen kis hiba a $2300\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$

tartománybeli levonásban jelentős hibát okozhat az ezen alapuló, amid I sávbeli levonásnál.

A másik probléma az, hogy, még ha tökéletesen határoznánk is meg a levonandó víz mennyiségét, a fehérje oldatokban a deformációs sáv szélessége eltér a tiszta vízben mérttől. Ezt a legszebben úgy lehet ellenőrizni, ha nehézvízben oldjuk fel a fehérjét, és összehasonlítjuk a D₂O deformációs sávjának (ez a sáv teljesen külön áll a spektrumban 1209 cm⁻¹ körül) fehérje jelenlétében mért szélességét a tiszta nehézvízben találttal. Fehérje jelenlétében a sáv szélesség mindig nagyobb, mint a tiszta nehézvízben. Nos, ez nyilván így van normál vízben is. A sáv szélesség megváltozásának elhanyagolása ahhoz vezet, hogy még tökéletes vízlevonás esetén is „hullámokat” teszünk rá az amid I sávra, amiket aztán a különböző „feloldás javító” (*resolution enhancement*) eljárások nagy érzékenységgel vesznek majd észre, és kombinálnak bele az általuk sugallt másodlagos szerkezetbe.

A kézenfekvő megoldás az, hogy amikor csak lehet, nehézvízben dolgozunk. Itt a természet a kezünkre játszik, mert egyrészt a most az amid I sáv tartományába eső D₂O kombinációs sáv széles, és sima, így nem okoz torzítást az amid I' sáv analízisében, másrészt nem kell tökéletesen deuterálniak lennie a mintánknak, ami nem is lehet, a fehérjékből kicserélődő H atomok miatt. Ezek a H atomok a nagy fölöslegben levő D₂O molekulákkal leginkább HOD hibrid vízmolekulákat fognak adni, amiknek deformációs rezgése az 1450 cm⁻¹ körüli amid II' sávval fed át, így szintén nem zavarja az amid I' sávot.

Az amid I sáv

A probléma, amit a fehérjék infravörös spektrumának analízise során meg kell oldanunk, a következő: Elvben minden egyes peptidkötés C=O csoportja kicsit különböző frekvenciánál rezeg, hiszen nincsen két tökéletesen egyforma helyzetű peptidkötés a fehérjében. Ezért van az, hogy az amid I sáv széles, és tartalmazza a fehérje másodlagos szerkezetére vonatkozó összes információt. A fehérje másodlagos szerkezetének megértéséhez a feladat az lenne, hogy bontsuk fel az 1700-1600 cm⁻¹ közötti amid I sávot ezekre az egyedi rezgésekre, és akkor pontosan tudnánk, mi a helyzet a fehérjében. Azonban az így nyert kép alapján nem tudnánk

egyszerűsítő, a szerkezet és a funkció összevetésére alkalmas képhez jutni. Szerencsére, a peptidkötések jellegzetes másodlagos szerkezeti elemekbe csoportosíthatóak, amikben a peptidkötések frekvenciája többé-kevésbé azonos. Ilyen másodlagos szerkezeti elemek az α -hélix, a β -redőzött szerkezetek, vagy éppen az ilyen szerkezeti elemek hiánya, a rendezetlen fehérje részek is. Az eredeti feladat így arra szűkül, hogy több tucat, több száz helyett, csak három, négy, öt komponensre bontsuk fel az amid I sávot. A felbontáshoz azonban meg kell határoznunk, hogy hol számíthatunk komponensekre. Erre tulajdonképpen két módszert használnak:

1. Az infravörös spektrumok második deriváltjának minimumaiból meghatározni az esetleges komponensek számát, a későbbi illesztéshez használható kezdőfrekvenciákat.
2. Fourier ön-dekonvolúcióval (Fourier self deconvolution) meghatározni a komponensek számát, középfrekvenciáit.

Az amid I sáv felbontása második deriválttal

A második derivált alkalmazásának szigorú kritériumai vannak az eredeti spektrum jel/zaj viszonyának tekintetében, mert a két deriválás igencsak felerősíti a zajokat, mégpedig annál inkább, minél kisebb a zajnak tekinthető sávok szélessége. Tipikusan ilyen probléma a vízgőz spektrumának kezelése az amid I tartományban. A vízmolekulák forgásából származó sávok pár hullámszám szélességük és igencsak változó intenzitásúak (spektrumukat lásd a [8.B. ábrán](#)). Sajnos nagyon sok kutató nincs tisztában azzal, hogy mennyire pontosan kell levonni a vízgőz spektrumát az amid I tartományban ahhoz, hogy ne kapjunk műtermékeket. Számomra a legszebb példa e tekintetben Byler és Susi híres cikke még 1986-ból (37), amely mostanáig 980 - nem kritizáló - hivatkozást kapott. Ebben az egyébként alapos munkában 17 fehérje infravörös spektrumát vették fel, és az amid I sáv második deriváláson alapuló felbontásának módszerével meghatározták a fehérjék másodlagos szerkezetét. Az amid I sávban összesen 11 komponenszt találtak, amiket hozzá is rendeltek a megfelelő másodlagos szerkezetekhez. A munka hitelét növelni látszott, hogy a vízgőzt az eredeti spektrumokból gondosan levonták, a spektrumokat

simították, a második deriválást polinommal való simítással kombinálták. Ennek eredményeként nagyon szép egyezést mutattak ki a 17 fehérje másodlagos szerkezeti elemekhez rendelhető karakterisztikus frekvenciái között, az eltérések az egyes fehérjék között ugyanarra a másodlagos szerkezeti elemre vonatkozóan maximum 3-4 hullámszámot tettek ki.

Azt sajnos elfelejtették ők is, és idézőik is megtenni, hogy összehasonlítsák az így kapott, a másodlagos fehérje szerkezeti elemekre jellemzőnek tekintett frekvenciákat a vízgőzével. Ha ezt megtesszük, akkor a következő, érdekes és tanulságos eredményre jutunk ([I. táblázat](#)).

A természet harmóniájának igencsak csodás képzetét adná, ha a fehérje mindegyik, valamilyen másodlagos szerkezethez köthető $\nu(\text{C=O})$ frekvenciája ilyen pontosan megegyezne a vízgőzével. Nyilvánvalóan arról van itt szó, hogy a vízgőz spektrumok levonása minden igyekezet ellenére sem volt tökéletes. Maradt valamennyi vízgőz jel a spektrumokban, amit a deriválás során használt simítás sem tudott eltüntetni, legfeljebb kicsit szétkent.

I. táblázat: Az amid I sávkomponenseinek középfrekvenciái a spektrum második deriváltjából kiinduló szerkezet meghatározás esetében

amid I	1624(4)	1631(3)	1637(3)	1645(4)	1653(4)	1663(4)	1671(3)	1675(5)	1683(2)	1689(2)	1694(2)
vízgőz	1623.5		1635.4	1646.2	1652.9	1662.6	1669.2	1675.2	1684.2	1689.6	1695.8

A zárójelben levő számok a középfrekvenciától a 17 vizsgált fehérje valamelyikében talált legnagyobb eltérést mutatják. Az alsó sorban a vízgőz sávok általunk mért frekvenciái az amid I tartományban. Minden vízgőz sávot feltüntettünk, ahogy jöttek egymás után.

A fenti példával nem azt akartuk bemutatni, hogy a spektrumok második deriváltján alapuló módszer használhatatlan, hanem azt, hogy mindig megfelelő óvatossággal kell eljárni, különösen akkor, ha valamilyen oknál fogva olyan kicsi a fehérjéből származó infravörös abszorpció a vízgőzéhez képest, hogy látható, hogy

semmiképpen nem tudjuk a szükséges jel/zaj feltételeket teljesíteni. (Ezzel a témával az anyagok és módszerek részénél, saját metodikai fejlesztéseink bemutatásánál külön foglalkozom majd.)

A második deriválttal más megengedhetetlen dolgokat is művelnek, amiknek eredményeit, sajnálatos módon, komoly folyóiratokban is közölni lehet (38;39). A leggyakoribb hiba, amit elkövetnek az az, hogy egyszerűen úgy akarják meghatározni az eredeti spektrumban levő komponenseket, sőt mi több, összehasonlítani egy fehérje komponenseit egy másik fehérje komponenseivel (azaz pl. az α -helix és a β -szerkezet tartalmát két különböző fehérjében), hogy kiszámolják az infravörös spektrum második deriváltját. A második deriváltat a jobb kinézet kedvéért (hogy abszorpciós spektrum benyomását keltse) megszorozzák mínusz eggyel, és azután illesztik az így kapott sávokat mondjuk Gauss görbével (38), de úgy, hogy alapvonalnak a második derivált (most már) negatív szélsőértékei által meghatározott görbét veszik. Ezt a görbét vonják le aztán a második deriváltból, pont ugyanúgy, ahogy egy mért spektrumnál az általában szokásos (39). Az ezután kapott intenzitás értékeket tekintik azután egy adott másodlagos szerkezet fehérjén belüli mértékének¹⁷.

A második deriváltakat tisztességgel, nézetem szerint, csak arra lehet használni, hogy gondos mérlegelés után meghatározzuk azokat a frekvenciákat, amelyeket induló paraméterként beviszünk az eredeti spektrum komponensekkel való illesztésébe.

Az amid I sáv felbontása Fourier ön-dekonvúcióval

A második lehetőség a Fourier ön-dekonvolúció (Fourier self deconvolution) módszere, aminek kidolgozása a kanadai infravörös spektroszkópai iskolához köthető (40). A módszer abból indul ki, hogy a mért infravörös spektrumban az amid I sáv azért olyan széles, mert nem megfelelő a spektrométer átviteli függvénye. Ezért az eredetileg sokkal keskenyebb, a fehérjék másodlagos szerkezetére jellemző sávok,

¹⁷ Itt csak egy szerzőtől idéztünk több cikket, de a jelenség általánosabb, a közelmúltban a fenti okokért német, román, japán szerzők cikkeit kellett nekem, illetve kollégáimnak a bírálás során visszautasítani, vagy ezeket a megközelítéseket az elfogadás feltételeként kigyomláztatni.

és a spektrométer átviteli függvényének konvolúcióját mérjük¹⁸. A dekonvolúció kezdeti paramétereként feltételezik (meglehetősen önkényesen), hogy milyen szélesnek is kellene lennie az egy-egy másodlagos fehérje szerkezetéhez köthető sávnak, és utána ennek alapján csinálják a dekonvolúciót. Attól függően, hogy milyen elméleti szélességet adtak a komponenseknek, ha nagyobb, akkor csak „hullámos”, ha kisebb, akkor elkülönült sávokat mutató amid I sávot kapnak a dekonvolúció után.

A módszer nagy népszerűségnek örvend, olyannyira, hogy az eredeti kidolgozóknak külön cikkben kellett felhívniuk a figyelmet a hibás használatból eredő veszélyekre (41). Használják oly módon is, hogy a dekonvolúció után kapott spektrumhoz illesztnek Gauss/Lorentz komponenseket, és az ezekre kapott intenzitásarányokat tekintik mérvadónak a másodlagos szerkezetek egymáshoz viszonyított mennyiségére az adott fehérjében.

Szerintem, mint a fentebb tárgyalt második deriváltakat használó módszer esetében is, a józan önmérséklet lehet célravezető. Ha a dekonvolúciót arra használjuk, hogy kezdő paramétereket kapjunk a valódi spektrumok illesztéséhez, akkor a módszer rendben van, viszont ha minden következtetésünket csak a dekonvolúcióból magából származó eredményekből vonjuk le, akkor önkényes feltételezéseink rabjai maradunk.

Az amid I sáv teljesen korrekt illesztéséhez figyelembe kellene venni az ebben a tartományban jelentkező aminosav oldallánc elnyeléseket is (42-44). Ez azonban csak ritkán történik meg. Meg kell azonban jegyezni, hogy erre csak akkor van igazán szükség, amikor valami okból a másodlagos szerkezetek abszolút mennyiségére vagyunk kíváncsiak. A legtöbb amid I sáv illesztés során nem veszik figyelembe az aminosav oldalláncok elnyelését, sőt, a legtöbb másodlagos szerkezet meghatározás során csak húznak egy egyenes alapvonalat a fehérje infravörös spektrumának 1700 és 1600 cm^{-1} -nél levő pontjai között, és úgy tesznek, mintha az amid I sáv csak az ezen egyenes fölötti részből állna.

¹⁸ Ez a feltételezés szerintem erősen megkérdőjelezhető, mert ugyanezek a spektrométereken remekül fel lehet oldani pl. a vízgőz néhány hullámszám szélességű sávjait, tehát a spektrométer hűen viszi át a spektrumokat. Az amid I sáv kiszélesedése szerintem a fehérjében levő peptidkötések heterogenitásából adódik, amivel tudtommal általában nem foglalkoznak a módszer alkalmazói.

Ha csak arra vagyunk kíváncsiak, hogy mi történik egy adott fehérje szerkezetével külső behatás, pl. a hőmérséklet emelkedése következtében, és ezt a viselkedést akarjuk összehasonlítani egy másik fehérje ugyanilyen behatásra mutatott viselkedésével, akkor általában eltekinthetünk az aminosav oldalláncok hozzájárulásától, és az alapvonal önkényes meghúzása is bocsánatosabb bűn.

Az amid I tartomány hozzárendelése a fehérje másodlagos szerkezetéhez

Ennyi „lesújtó” kritika után az olvasó azt is hihetné, hogy nincs is semmiféle közmegegyezés arról, hogy az amid I tartomány hogyan rendelhető hozzá a fehérje másodlagos szerkezeti elemeihez. Szerencsére van ilyen közmegegyezés, az 1700-1600 cm^{-1} tartomány általában biztonsággal feloldható 3-5 komponensre, és ezek megfeleltetéséről közmegegyezés alakult ki az irodalomban. Ennek illusztrálására bemutatok egy táblázatot ([II. táblázat](#)), és később egy saját ábránkat is ([9. ábra](#)), ami a második deriváltakra alapozva jelöli ki az egyes másodlagos szerkezetekre jellemző komponensek helyét az amid I tartományban (36;38).

Az amid II sáv

Az amid II sávban a $\nu(\text{C=O})$ rezgés hozzájárulása a módushoz kicsi, a legnagyobb hozzájárulást a $\delta(\text{N-H})$ deformációs rezgés adja. Ez a sáv 1550 cm^{-1} körül helyezkedik el, pontos frekvenciája valamelyest természetesen szintén függ a fehérje másodlagos szerkezetétől, a döntően α -helikális fehérjékben 1545-1550 cm^{-1} -nél, a döntően β -szerkezetű fehérjékben 1525-1530 cm^{-1} -nél van (az adatok részletes összehasonlítását lásd Goormaghtigh kiváló összefoglalójában (45)). Nem tudok róla, hogy ezt a tulajdonságát kihasználták volna fehérje másodlagos szerkezetek vizsgálatában.

II. táblázat: Az amid I sáv (1700-1600 cm⁻¹) hozzárendelése a fehérjék másodlagos szerkezetéhez

Konformáció	Frekvencia (cm ⁻¹)
α -hélix	1648-1655
β -redőzött szerkezet - antiparalell	1630-1636 1690-1693
β -redőzött szerkezet - paralell	1630 1645
Rendezetlen	1656-1660
Hajtű	1666-1680
Intermolekuláris β -szerkezet (denaturáció)	1616-1620 1684

Az adatok különböző közlemények összefésülésén alapulnak, a tól-ig határok az irodalomban fellelhető szélsőértékeket mutatják

Az amid II sáv igazi jelentőséggel a fehérjék dinamikájának vizsgálatában bír. Ennek a szerepnek az az alapja, hogy az 1550 cm⁻¹ körül levő δ (N-H) deformációs rezgés igen érzékeny a H $\leftrightarrow$ D cserére. A δ (N-D)-t tartalmazó peptidkötés módus frekvenciája 1450 cm⁻¹ körül van. Ezért aztán, ha pl. egy vízben oldódó fehérjét liofilizálunk, és utána nehézvízbe tesszük, az azonnal meginduló H $\leftrightarrow$ D kicserélődés következtében 1550 cm⁻¹ körül amid II sáv intenzitása csökkenni, 1450 cm⁻¹ körül amid II' sáv intenzitása növekedni kezd¹⁹.

¹⁹ Valójában az 1450 cm⁻¹ táján lévő sáv egy másik okból is növekedni fog. A fehérjékből kicserélődő H atomok ugyanis a nehézvízes közegben leginkább H-O-D hibrid vízmolekulákba kerülnek, és az ilyen vízmolekulák deformációs rezgése szintén e körül a frekvencia körül van. Emlékeztetőül: a H-O-H deformációs rezgése 1643 cm⁻¹, a D-O-D deformációs rezgése 1209 cm⁻¹ táján van. Ez a jelenség a biológiai anyaghoz képest viszonylag kevés vizet tartalmazó minták, mint pl. a membrán szuszpenziók, esetében számottevő.

Ez volt az a terület, amit a Fourier transzformációs spektrométerek (amelyek nagy érzékenyséjük következtében már tudják kezelni a víztartalmú mintákat is) megjelenése előtt intenzíven műveltek a fehérjék szerkezetének vizsgálatában. A hagyományos diszperziós infravörös spektrométert ráállították az amid II sávra. A mintatartóban gyorsan összekeverték a liofilizált fehérjét nehézvízzel, és mérték az amid II sáv eltűnését az idő függvényében (46)²⁰. Ez az eltűnés egy, különböző időállandójú exponenciálisokból összetett folyamat volt, amit azonban egyszerű, grafikus módszerekkel, a leghosszabb időállandótól a rövidebbek fele haladva, szépen föl lehetett „fejteni”. Az így kapott, három-négy különböző időállandójú amid II eltűnést aztán hozzá lehetett rendelni a fehérje egy-egy részéhez, amelyben a H→D kicserélődéshez szükséges dinamikai feltételek hasonlóak voltak. Ezzel a módszerrel elsősorban a vízben oldódó fehérjéket lehetett jellemezni.

LIPID-FEHÉRJE KÖLCSÖNHATÁSOK

A lipid-fehérje kölcsönhatások vizsgálatában nagy szerepe van a különböző modell rendszereknek. Az egyik lehetőség, hogy tetszésünk szerint megválasztott lipidekből modell membránokat építünk fel, és megnézzük, hogy egyes fehérjék hogyan hatnak kölcsön ezekkel a membránokkal. A fehérjék lehetnek perifériális, vagy integráns membrán fehérjék.

Ilyen megközelítéssel mutatták ki például, hogy a zsírsavszállító fehérjék (*fatty acid binding proteins*) lecsökkentik a modell membrán gél→folyadékkristály fázisátmenetének hőmérsékletét. Ha a membránbeli zsírsavak telítetlenek, akkor ez a hatás erősebb. Ugyancsak erősebb a kölcsönhatás az anionos fejcsoportú lipidekkel, mint a kettős ionosokkal (zwitterion). A lipid-fehérje kölcsönhatásban nagy szerepet játszik a fehérje töltése, de a fehérje másodlagos szerkezete gyakorlatilag érintetlen marad. Ez a fajta kölcsönhatás tipikus a perifériális membrán fehérjékre (47).

²⁰ Ez a hivatkozás itt is eszembe juttatja diplomamunka témavezetőmet, Závodszy Pétert, akinek egyébként is sok köszönettel tartozom.

Integráns membrán fehérjék esetében is jól alkalmazhatóak első lépésként a modell rendszerek, amikor modell membránokban építenek be egy egyszerű szerkezetű polipeptidet (pl. gramicidin A) (48), vagy nagy, összetett szerkezetű fehérjéket (49). Az ilyen kísérletekben nagyon előnyös a teljes visszaverődéses infravörös spektroszkópia (ATR) alkalmazása, mert információval szolgál a minta egyes komponenseinek (pl. a fehérjék α -héliceinek) orientációjáról is. Ugyancsak egyre gyakoribb, hogy a spektroszkópai adatokat kombinálják molekula modellek számolásával is, kiválasztva a sok, a spektroszkópia által megengedett lehetőség közül azokat, amik összeférnek a molekulák tényleges méreteivel, elhelyezkedésével.

A fehérje-lipid kölcsönhatás „természet közelebb” vizsgálatát jelenti, ha megnézzük, milyen a lipidek dinamikája a természetes membránban, és milyen a membránból kivont lipidekből készített modell membrán rendszerben (50). Az ilyen vizsgálatoknál azonban figyelembe kell venni, milyen lipidek vannak a biológiai membránban. Ha vannak a lipidek között olyanok, amik magukban nem képesek kettősréteg kialakítására (pl. a galakto-lipidek a tilakoid membránokban), akkor a modell lipid membrán dinamikája elsősorban nem a fehérjék hiánya miatt lesz más, hanem az egészen különböző lipid konformációk miatt.

A Singer-Nicholson modell még nem számolt azzal, hogy a lipideknek és a fehérjéknek lehet annyira „bensőséges” a kapcsolata, hogy vannak olyan lipidek, amelyek (i) szorosan kötődnek a fehérjék felszínéhez, (ii) fejcsoportjaikkal, vagy zsírsavláncaikkal behatolnak a fehérjék felszíni üregeibe, (iii) teljesen a membránfehérje belsejében helyezkednek el (51).

A membránban megjelenő lipid-fehérje kölcsönhatásokat többféle spektroszkópai módszerrel (ESR, röntgen, fluoreszcencia, stb) vizsgálták, mi minden esetben az infravörös spektroszkópiát használtuk. Az infravörös spektroszkópia egyedülálló abban a tekintetben, hogy ugyanabban a spektrumban találunk elsősorban lipidekre, illetve elsősorban a fehérjékre jellemző tartományokat, amelyek, mint fentebb megmutattuk, elkülönülten helyezkednek el egymástól. Ezért, ha ezen tartományok viselkedése között bármilyen összefüggést találunk, akkor az csak valamilyen lipid-fehérje kölcsönhatás következménye lehet.

Voltak olyan adataink, amik első pillantásra ellentmondani látszottak az egyéb módszerekkel kapottaknak (52), és hosszabb, az infravörös spektrumok megfelelő interpretálására irányuló munka **(53)** volt szükséges ahhoz, hogy megértsük eredményeinket, amelyeket részletesen bemutatok a dolgozatban.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Ebben a fejezetben a minimumra fogom szorítani a minták elkészítésére, a használt kémiai anyagokra vonatkozó információkat, lévén, hogy azok teljes részletességgel megtalálhatók a megfelelő közleményekben.

Ha biofizikai, vagy egyéb, összetett, sokszor önmagában is tudományos területet jelentő módszert alkalmazunk, gyakran felmerül a „vád”, hogy metodika centrikus a kutató, nincs valódi problémája, aminek a végére akar járni. Nos, én úgy érzem, hogy sokszor valójában nemhogy egy sincs, de két valódi probléma is van itt. Az egyik, hogy az alkalmazott módszert képessé tegyem a megoldandó „tudományos” kérdés megfelelő vizsgálatára, a másik maga a tudományos (esetünkben biológiai) probléma.

Ennek megfelelően, az értekezések hagyományos felosztásának megtartásával, kicsit átalakítottam a dolgozatot, mégpedig úgy, hogy a jelen *Anyagok és Módszerek* fejezet *Módszerek* részében tárgyalom meg azokat a metodikai fejlesztéseinket is, amiket egyébkény tudományos eredménynek is tekintek. Ezután fogom megtárgyalni a tisztán biológiai problémák megoldásában részben éppen módszertani fejlesztéseinknek köszönhetően kapott eredményeinket az *Eredmények és Diskusszió* fejezetben.

Anyagok

A mérésekhez felhasznált vegyszerek standard biokémiai vegyszereket forgalmazó cégektől származtak, és további tisztítás nélkül használtuk fel őket, specifikációjuk megtalálható az adott saját közleményben, ezért itt nem is sorolom fel őket. E tekintetben kivételt képez a nehézvíz, aminek egy részét a Központi

Fizikai Kutató Intézettől, annak korábbi szovjet importból megmaradt készletének átdesztillálása után vásároltuk, egy másik részét pedig ajándékba kaptuk²¹.

Módszerek

FOURIER TRANSZFORMÁCIÓS INFRAVÖRÖS SPEKTROSKÓPIA (FTIR)

A Fourier transzformációs infravörös spektrumok egy kis hányadát egy Nicolet Magna 560 spektrométerrel mértem Japánban. A spektrumok legnagyobb részét itthon vettem fel, egy Philips PU9800 és egy Bruker IFS66 spektrométerrel. Az itthoni spektrométereket jól felkészítettük a mérések elvégzésére. Mivel szinte mindig a hőmérséklet függvényében vettem fel spektrum sorozatokat, több, számítógép-vezérelt hőmérséklet szabályzót is készítettünk, mindegyiket egy-egy feladatra optimalizálva²².

Az átmenő fénnel mért, „hagyományos” infravörös abszorpciós spektrumok felvételéhez egy kétállású, szintén számítógépről vezérelhető, az infravörös sugárba ki-, beállítható mintatartót készítettünk²³. Ezáltal lehetővé vált, hogy háttér és minta spektrumokat vegyünk fel a mintatartó-tér kinyitása nélkül.

Transzmissziós abszorpciómérések

A transzmissziós abszorpciós spektrumok esetében a mérési ciklus a következő volt:

²¹ MURATA Norio professzortól, akinek szakmai fejlődésem szempontjából nagyon sokat köszönhetek, majd minden látogatásomkor kaptunk ajándékba, itthoni támogatásunkkal szinte összemérhető értékben, vegyszereket, köztük 2 liter nehézvizet, amiket egyébként nem lett volna pénzünk megvenni.

²² Itt szeretném megköszönni Bagyinka Csabának, hogy szívességből mindig megírta a számítógép kártyák vezérlőprogramját, Kóta Zoltánnak is köszönöm egy vezérlőprogram megírását.

²³ A mintatartó speciális motorja Virág Tibor ajándéka, a mozgató szoftvert Ormos Pál készítette sok évvel ezelőtt, még más célra, de itt is jól bevált.

Háttér mérése → minta mérése → az abszorpciós spektrum kiszámolása → az aktuális hőmérséklet megmérése → új hőmérsékleti érték beállítása → várakozás, amíg beáll az új hőmérséklet. Ezt a ciklust ismételtük a beállított hőmérsékleti határok között. A dolgozatban szereplő spektrumokat mind emelkedő hőmérsékletek mentén vettük fel, a hőmérséklet emelése 2-3 °C-os lépésekben történt.

A mérések szempontjából apró újdonságot jelent, de sokban hozzájárult az eredményekhez, hogy spektrumainkat a korábban általában használt 4 cm⁻¹ spektrális feloldás helyett 2 cm⁻¹ feloldással vettük fel, és hogy a Bruker spektrométeren, ahol erre lehetőség volt, a transzmissziós spektrumok felvételénél általában használt DTGS detektor helyett a kb. 50-szer érzékenyebb, és 20-szor gyorsabb, cseppfolyós nitrogén hőmérsékletén dolgozó MCT detektort használtuk. Ennek következtében egyes spektrumainkat 1024-2048 interferogramm átlagából számolhattuk, szemben az irodalomban általában használt 16-32-vel. De a DTGS detektor esetében is legalább 128 interferogrammot átlagoltunk²⁴.

Teljes visszaverődéses (ATR) mérések

A teljes visszaverődésen alapuló (ATR) méréseket Bruker IFS 66 spektrométeren végeztük, a belső teljes visszaverődés ZnSe elemekben történt, egy trapezoid, illetve egy hengeres elemet használtunk. A módszer részletes leírását lásd a (54) közleményben. Arra a kísérleteknek már korai szakaszában rájöttünk, hogy a hőmérséklet stabilitás az ATR méréseknél különösen fontos, ezért mindkét fajta visszaverő elem számára termosztált mintatartót építettünk. A mintatartók átáramlós rendszerűek voltak, a mintákat perisztaltikus pumpával áramoltattuk a ZnSe kristály körül.

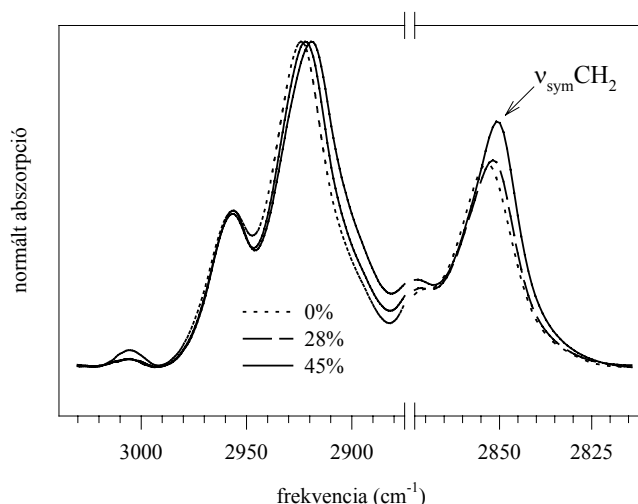
²⁴ Hogy a megfelelő jel/zaj viszony mit jelent, azt jól megtanultuk a transzgenikus dohány tilakoid membrán spektrumokon (lásd ott), amiket háromszor vettünk fel, először Japánban egy egészen egyszerű spektrométeren, másodszor a mi Philips spektrométerünkön, harmadszor Bruker spektrométerünkön MCT detektorral. Valami tendencia látszott az egyszerű spektrométeren, jobban a Philips-en, de a végül megkapott részletes, finom változásokat az MCT detektorral 1024-2048 interferogramm átlagából mértük.

KIÉRTÉKELÉSI MÓDSZEREK**A rendezett és rendezetlen lipid zsírsavlánc szegmensek hozzájárulásának szétválasztása a νCH_2 sávokban (Saját eredmény [S1])**

Mint azt az Irodalmi áttekintésben is említettem, munkánk kezdetekor egyáltalán nem volt kielégítően megoldva a $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ rezgéseknek a lipid fázisátalakulás során tapasztalt magasabb frekvenciák felé való eltolódásának magyarázata. Ehhez a problémához két „zavaró” kísérleti eredmény vezetett el bennünket: (i) Az Irodalmi áttekintésben már röviden említett *in situ* deuterálásos kísérlet, amikor azt tapasztaltuk, hogy a reakcióidő növelésével egyre több a sztearinsav lánc (18:0) az eredetileg tisztán olajsav láncokat (18:1) tartalmazó lipid keverékben. Ez tükröződött is a $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ rezgések egyre alacsonyabb frekvenciájában. Ezzel szemben a νCD rezgés frekvenciája változatlan maradt ezekben az egyre telítettebb lipid keverékekben. (ii) Az a kísérleti eredmény, miszerint cianobaktériumok tilakoid és plazma membránjait (egy sejten belül ezeknek zsírsavösszetétele gyakorlatilag azonos) összehasonlítva, azt kapjuk, hogy a hagyományos kiértékelés/terminológia szerint a tilakoid membránban a lipidek „fluidabbak”, mint a plazma membránban. Ez pedig ellentmondani látszott az ESR spektroszkópiai eredményeknek, amik rendre azt hozták ki, hogy a plazma membránokban nagyobb a spinjelzett próbák mobilitása azonos hőmérsékleten (Ezeket a vizsgálatokat majd részletesen ismertetem az Eredmények és Diskusszió fejezetben.).

Ha meg akarjuk érteni, hogy növekvő rendezetlenségű rendszerekben a $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ sáv miért szélesedik ki és tolódik el magasabb frekvenciák felé (55), két lehetséges okot kell megvizsgálnunk. Az egyik lehetőség az, hogy megváltozik az erőálló a C és a H atom között (mint az megtörténik, például a N-H kötésben, ha a H atom hidrogénkötésbe lép). Ebben az esetben a $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ sáv frekvenciája inkább a molekulák közti kölcsönhatásokat tükrözné, és nem annyira az adott molekula saját viszonyait. A másik lehetőség, hogy a $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ rezgés frekvenciáját annak a zsírsavlánc szegmensnek a konformációja határozza meg, amelyiknek ő maga is része. Eszerint más frekvencia tartozna egy olyan CH_2 csoporthoz, amelyik *transz* és

más egy olyan CH₂ csoporthoz, amelyik *gauche* szegmensben van²⁵. Ebben a második esetben a $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ frekvenciának inkább a zsírsavlánc konformációjára, semmint a környezeti hatásokra kell érzékenynek lennie. Ez az eset felelne meg a CH₂ bólogató rezgés változásaiból levonható következtetéseknek is.



3. ábra: Tiszta DOPC-ből induló (0%), deutériummal fokozatosan telített lipid keverékek infravörös spektrumának C-H rezgési tartománya. Figyeljük meg, hogy növekvő telítettségénél (28%, ill. 45%) az eredetileg 2853 cm⁻¹ táján levő $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ sáv - összhangban a telítettebb lipid keverékek nagyobb rendezettségével - alacsonyabb frekvenciák felé mozdul el.

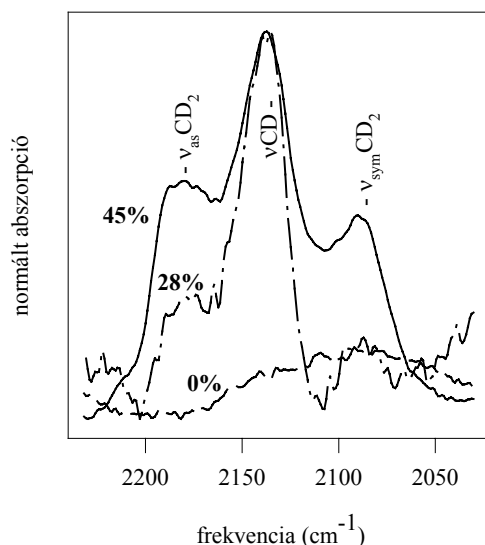
Hogy eldönthessük, melyik a két lehetőség közül az, amelyik jobban leírja a lipidek FTIR spektrumának növekvő rendezetlenségű rendszerekben megfigyelt változásait, egy olyan modell rendszerre volt szükségünk, amelyikben a zsírsavláncok közti hatások elválaszthatóak a zsírsavláncokon belüli konformációs hatásoktól.

Az eredetileg tisztán dioleil foszfatidil-kolinból (DOPC) álló liposzómák fokozatos deuterálása pontosan ilyen modell rendszert kínál. A vezikulákat a vízdékony katalizátorral való különböző időtartamú reakciókban (31;56)

²⁵ Időközben finomodott a véleményünk erről a kérdésről. Ma úgy gondolom, hogy nem feltétlen egy szegmensről, hanem inkább az adott lánc egész konformációjáról van szó, ahol az egyes CH₂ csoportok rezgései aszerint csatolódnak, hogy mekkorák a láncban a transz szakaszok, mennyi a törés a láncokban. Ha több a törés, rövidebbek a transz szakaszok, magasabb a $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ frekvencia. Az eredeti, szűkebb értelmezés nem mond ennek ellent, inkább a probléma első megközelítésének tekinthető, ezért eredeti formájában tárgyalom, mert a továbbiakban így jobban kiderül, hogyan haladtunk előre a probléma kezelésében.

reagáltattuk, és így 0% (tiszta DOPC), 28% és 45% sztearinsav (S) tartalmú elegyekhez jutottunk. A telítettség mértékét gázkromatográfiával ellenőriztük (53). Ezután a lipid keverékekből hidratált sokrétegű modell membránokat készítettünk, amiknek infravörös spektrumában külön tudtuk tanulmányozni a $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$, illetve a νCD rezgések viselkedését. A CD csoportok ideális jelölést jelentenek, mert kémiai azonosak a CH csoportokkal, a νCD rezgés viszont teljesen elkülönült, más csoportok hozzájárulásától nem átfedve jelenik meg az infravörös spektrumban. Azt korábban megmutattuk, hogy a νCD rezgés ugyanúgy érzékeny a lipid többszörös kettősrétegek fázisviszonyaira, mint a C-H rezgések (31).

A CH_2 csoportok tekintetében a deuterált DOPC keverékek heterogének, mert azok egyaránt jelen vannak a telítetlen és a telített zsírsavláncon. A minták 0%,



4. ábra: Multilamelláris, részlegesen deuterált DOPC keverékek C-D rezgési tartománya. A százalékok a görbék mellett a telített zsírsavláncon arányát jelzik. Vegyük észre, hogy a νCD frekvencia nem változik a telítettség növekedésével. Amennyire az alacsonyabb jel/zaj viszony látni engedni, a νCD_2 frekvenciák sem.²⁶

²⁶ A jelentős mennyiségű CD_2 csoport megjelenése, mint azt az Irodalmi áttekintésben említettem, váratlan volt. A részletes vizsgálatok kimutatták (30), hogy ez a katalizátor egy korábban fel nem ismert tulajdonságának következménye, miszerint szoros kapcsolatba kerül a neki rendelt molekulával, és egészen a reakció leállításáig oda-vissza cserélgeti a H vagy a D atomokat, attól függően, miből van sok a közegben. Számunkra mindebből most csak az a fontos, hogy CD_2 csoportok csak ugyanazokon a szegmenseken alakulhatnak ki, mint ahol a CD csoportok, azaz a korábban telítetlen $\text{C}_9\text{-C}_{10}$ szénatomoknál.

28% és 45%-ban tartalmaztak telített és telítetlen zsírsavakat, nem is beszélve arról, hogy négyféle lipid volt bennük jelen: DOPC, OSPC, SOPC és DSPC. Ez a heterogenitás meg is jelenik a $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ sáv frekvenciájában, hiszen ahogy a minták telítettsége nő, úgy csökken a sáv frekvenciája ([3. ábra](#)).

Amikor csak olajsav láncok vannak a lipid keverékben (tisztá DOPC), akkor az egész rendszer folyadékkristályos állapotban van, amihez magasabb ($\sim 2853\text{ cm}^{-1}$) $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ frekvencia tartozik ([3. ábra](#)). Ugyanezen a szobahőmérsékleten azonban a telített olajsav (azaz sztearinsav) láncok nincsenek megolvadva, egy tisztán sztearinsavból álló rendszer gél állapotban lenne, amihez egészen alacsony ($\sim 2850\text{ cm}^{-1}$ körüli) $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ frekvencia tartozna. Azaz, ahogy nő a telített sztearinsav láncok mennyisége a keverékekben, úgy lesznek azok egyre merevebbek, és ennek megfelelően tolódik lefele az egész keverék átlagára jellemző $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ frekvencia ([3. ábra](#)).

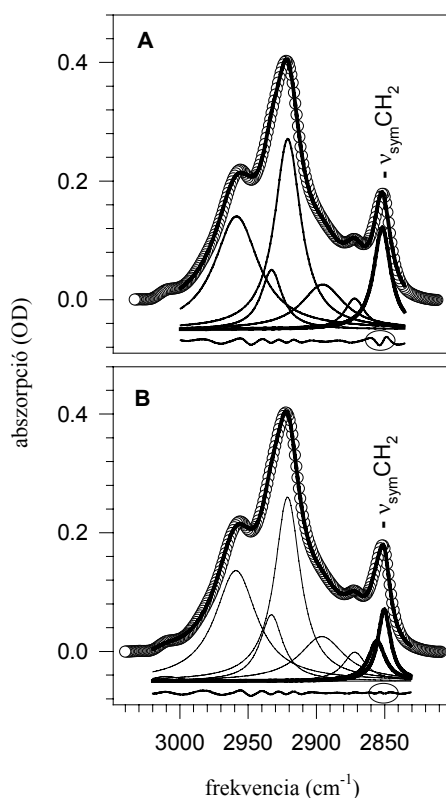
Lipid mintáink a C-D csoportok tekintetében homogének, mert csak a telített zsírsavláncokon, és minden láncon a 9-es és a 10-es pozícióban vannak C-D csoportok. A homogenitást tükrözi, hogy a $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ sávval ellentétben, a ν_{CD} sáv frekvenciája nem tolódik el a különböző keverékekben. Ezt jól mutatja a [4. ábra](#). Eszerint, a ν_{CD} frekvencia elsősorban annak a molekula szegmensnek a konformációjától függ, amelyiken helyet foglal. Ez a szegmens pedig szobahőmérsékleten a telített zsírsavláncokon mindig *transz* konformációban van, ezért a hozzá tartozó ν_{CD} frekvencia sem változik.

De ha ez igaz a ν_{CD} frekvenciákra, akkor igaz kell, hogy legyen a $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ frekvenciákra is, azaz ott is kell lennie egy meghatározott $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ frekvenciának a *transz* konformációban levő szegmensekre, és van egy másik, magasabb frekvenciának a *gauche* szegmensekre, és így a $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ frekvencia átlaga azért tolódik el alacsonyabb érték felé a telítettebb rendszerben, mert a láncokban megnő a *transz*, és ugyanakkor lecsökken a *gauche* szegmensek aránya.

Ha ezek a fenti következtetések igazak, akkor egészen másként kell hozzálátni az infravörös spektrumok kiértékeléséhez, mint azt eddig tettük. Fel kell tételeznünk, hogy két sáv helyezkedik el a $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ burkológörbéje alatt, és ennek a két sávnak a relatív intenzitása változik meg a különböző lipid keverékekben, vagy egy adott lipid

membránban, ha pl. a hőmérsékletet emeljük, és termikusan gerjesztünk egyre több *gauche* konformációt.

A fenti logikának megfelelően illesztettük egy, illetve két komponenssel a $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ sávot a membránok C-H nyújtási rezgési tartományának komponensekre való felbontásakor. A komponensek illesztéséhez Lorentz alakú görbéket használtunk, és a paraméterek fokozatos felszabadításával végül egy olyan illesztéshez jutottunk, amelynek minden paraméterét szabadon optimalizálta az illesztésre használt SPSERV[©] program²⁷.



5. ábra: Alacsony hőmérsékleten (5 C°) felvett *Synechocystis* PCC6803 tilakoid spektrum C-H rezgési tartományának felbontása komponenseire. A – a $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ sáv egy komponenssel illesztve; B – a $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ sáv két komponenssel illesztve. Vegyük észre, hogy az illesztés hibája, (körrel jelölve az A és B ábra alján), mennyire eltűnik két komponens használata esetén.

²⁷ A programot Bagyinka Csaba, az MTA SZBK Biofizikai Intézetének munkatársa, kedves kollégám készítette, és az elmúlt 15 év során igényeinknek megfelelően folyamatosan finomította. Minden, a doktori dolgozatban szereplő kiértékelésben ezt használtam, nemcsak a spektrumok illesztésére, hanem az SVD analízisekre, Fourier simításokra is. A program együttműködéseim révén már több külföldi laboratóriumban is meghonosodott, részletes ismertetése megtalálható Bagyinka Csaba akadémiai doktori disszertációjában.

Az [5. ábra](#) egy ilyen illesztés eredményét mutatja. Az ott kapott komponensek asszignációját a [\(III. táblázat\)](#) foglalja össze. A táblázatban feltüntettem egy teljesen telített lipidből, a dipalmitoil foszfatidil-kolinból (DPPC) álló modell membránon kapott adatokat is. Ebben a telített rendszerben 5 C°-on csak *transz* komponenseket találunk ($\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2 = 2851 \text{ cm}^{-1}$), nem úgy, mint a DOPC-ben, amiben 5 C°-on a telítetlen olajsav láncok még nagy részben rendezetlenek ($\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2 = 2853 \text{ cm}^{-1}$).

Mivel a $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ komponensei túlságosan közel vannak egymáshoz ahhoz, hogy akár második deriválttal, akár Fourier ön-dekonvolúcióval kimutathatóak legyenek, egyéb módon kellett meggyőződnünk létezésük valóságáról. Ha ezek a komponensek valóban a zsírsavlánc *transz* és *gauche* konformációjú szegmenseit tükrözik, akkor egymáshoz viszonyított arányuk a hőmérséklet emelésével el kell, hogy tolódjon a *gauche* konformációra jellemző, magasabb frekvenciájú sáv javára. A hőmérséklet növekedésének függvényében felvett spektrum sorozatnak pont egy ilyen arányeltolódással kellene leírhatónak lennie.

Egy spektrum sorozatban lezajló változások analizálására kiválóan alkalmas a szinguláris értékekre való felbontás (Singular Value Decomposition (SVD)) módszere. A módszer részletes leírásával itt nem foglalkozom, az nagyon részletesen megtalálható az irodalomban (57;58). Röviden, arról van szó, hogy a mért spektrumokból, mint vektorokból valamilyen külső paraméter (esetünkben a hőmérséklet) függvényében összeállított mátrix felbontható három mátrix szorzatára. Az első mátrix oszlopai tartalmazzák azokat az úgynevezett SVD bázis spektrumokat, amik a második (diagonális) mátrix megfelelő elemében szereplő súllyal, és a harmadik mátrix megfelelő sorában megjelenő „élettörténettel” (esetünkben hőmérsékletfüggéssel) leírják a változásokat. Egy ilyen analízishez nem kell semmilyen előzetes feltétel kiszabása, a felbontás tisztán a lineáris algebra szabályai szerint történik, nagyság szerint állítva sorba a változásokat. Ennek megfelelően, például ha a változás a hőmérséklet emelése, egy-egy SVD bázis spektrum pontjainak azonos az „élettörténete”, azaz a hőmérsékletfüggése, és az egymásra következő SVD bázis spektrumok egyre kisebb hozzájárulást jelentenek az összesített változáshoz, ami a hőmérséklet növelése során a spektrumokban lezajlott.

III. táblázat: A C-H nyújtási rezgési tartomány Lorentz komponensekkel való illesztésének eredményei különböző modell és biológiai membránokban

DOPC deuterált [⊕]		DPPC hőmérséklet*		Árpa tilakoid*		Asszignáció
Spektrum	SVD	Spektrum	SVD	Spektrum	SVD	
frekv.	frekv/szél.	frekv.	frekv/szél.	frekv.	frekv/szél.	
-	2850 /9	2851-54	2851 /14	-	2850 /8	$\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ - 'trans'
2853-51	2853 /20	-	2859 /17	2851-54	2856 /16	$\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ - 'gauche'
2872 ^F	2873 /11	2873-74	2873 /9	2873 ^F	2873 /23	$\nu_{\text{sym}}\text{CH}_3$
2899 ^F	2900 /34	2901-03	2899 /36	2892-97	2897 /40	Fermi rezonancia ^R
2924-18	2920 /26	2918-22	2919 /23	-	2918 /11	$\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$ - 'trans'
2930 ^A	2931 /20	2929-35	2932 /23	2921-27	2828 /34	$\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$ - 'gau'+(Fer ^S)
2959-58	2959 /23	2959-61	2960 /22	2959-62	2961 /33	$\nu_{\text{as}}\text{CH}_3$

Spektrum – Lorentz görbék illesztése külön-külön minden egyes spektrumhoz. Az alsó és felső értékek a minimum és maximum frekvenciákat jelölik, amiket DOPC-ben a növekvő deutérium telítés, a többi membránban a növekvő hőmérséklet hatására találtunk.

SVD – A Lorentz görbéket az első SVD bázis-spektrumhoz illesztettük.

[⊕]A változások a DOPC olajsav láncában levő kettőskötés növekvő (0%, 28% és 45%) deutérium telítettségének a következményei.

*A változások a növekvő hőmérséklet (5 C°-ról 65 C°-ra) következményei.

^AEz a sáv csak a 45%-ban telített mintában volt jelen.

^FEzeket a frekvenciákat és szélességeket le kellett rögzítenünk a spektrumok illesztése során.

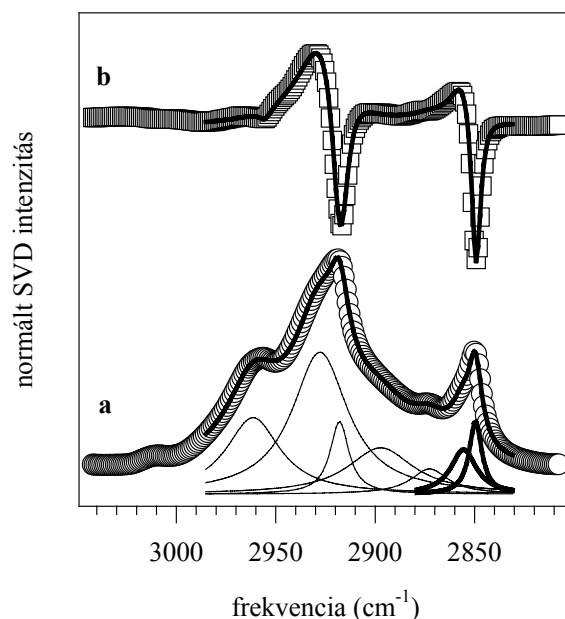
^RAz asszignáció részletes magyarázata Snyder és munkatársai közleményében található (59).

^SLehet, hogy a sávhoz hozzájárul egy a $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_3$ és a δCH_3 felharmónikusa közötti Fermi rezonancia is (60).

Ha elvégzünk egy ilyen SVD analízist, akkor, pl. tilakoid membránok esetében a [6. ábrán](#) látható eredményhez jutunk²⁸.

²⁸ Az SVD analízis során gondosan kell eljárunk, mert a görbéknek bármiféle változása meglátszik az analízisben, és esetleg nem a nekünk érdekes változást láthatjuk. Pl. ha változik a spektrumok alapvonala, az egy köztes, az első SVD bázis spektrumra hasonlító bázis spektrumot hoz be a [6. ábrán](#) látható „differencia” jellegű SVD bázis spektrum elé. Ugyanígy zavaró lehet az infravörös spektrumok intenzitásának szisztematikus megváltozása a mérés során.

Következő lépésként Lorentz komponensekkel illesztettük az első SVD bázis spektrumot ([6. ábra a görbe](#)), ami a spektrumok változatlan, közös részét mutatja. A második SVD bázis spektrum ([6. ábra b görbe](#)) alakja azt mutatja, hogy a legnagyobb változás, ami a hőmérséklet emelkedésével a spektrumban fellép, az a



6. ábra: Árpa tilakoid membrán 5-65 C° közötti 27 hőmérsékleten felvett spektrumsorozatának első (a) és második (b) SVD bázis spektruma. Az első (az „átlag”) SVD bázis spektrum adatpontjait a körök mutatják. Az alatta levő komponensekkel kapott illesztett görbe fut a körök illetve négyzetek belsejében. A komponensek között vastaggal húztuk ki a $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ sávhoz rendelt két komponenst.

$\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ sáv frekvenciájának a magasabb hullámszámok felé való eltolódása. Ha ez az eltolódás tényleg az első SVD bázis spektrum vastagabban kihúzott két komponensének vetélkedéséből származik, akkor a második SVD bázis spektrumot ugyanezekkel a komponensekkel (az első SVD bázis spektrumnál kapott frekvenciák és fél-szélességek rögzítésével) meg kell tudnunk illeszteni. Hogy ez valóban lehetséges, azt a második SVD bázis spektrum belsejében végigfutó illesztett görbe mutatja (a négyzetek a spektrum pontjait reprezentálják).

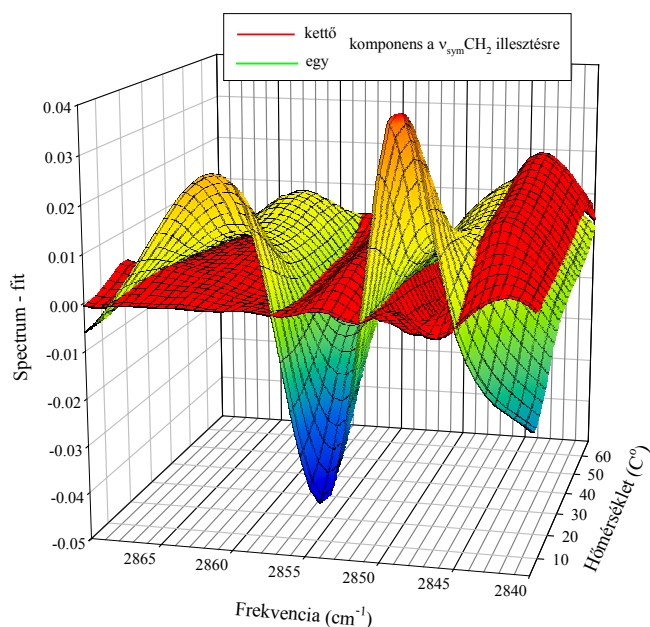
Természetesen a változások leírásához további SVD bázis spektrumokat is igénybe lehetne venni, mi azonban a bázis spektrumok súlyainak rendkívül gyors lecsengése alapján (a második SVD bázis spektrum súlya az elsőnek csak néhány

százaléka, a harmadik az ezrelékek tartományába esik) elhanyagoltuk a további SVD bázis spektrumokat.

Az SVD analízis alapján tehát igazoltnak láttuk, hogy a $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ sávnak a hőmérséklet növelésének hatására bekövetkező eltolódása a magasabb frekvenciák felé elsősorban annak következménye, hogy termikusan egyre több, magasabb $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ frekvenciájú rendezetlen szegmenst hozunk létre a membrán lipidek zsírsav láncában, miközben a rendezett szegmensek száma, és vele a hozzájuk tartozó alacsonyabb frekvenciájú $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ rezgés intenzitása csökken.

A fentiek alapján a membránok (akár modell akár biológiai) infravörös spektrumának lipidekre jellemző C-H rezgési tartományát tehát úgy kellene kiértékelni, hogy a $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ sávhoz két komponenset illesztünk, és pl. hőmérsékletfüggés vizsgálata esetén ennek a két komponensnek az intenzitását ábrázoljuk a hőmérséklet függvényében. Ilyen illesztések eredményét mutatja a [III. táblázat](#) fokozatosan deutériummal telített DOPC, tiszta DPPC modellmembránokra és egy biológiai membránra, árpa tilakoidra.

Az eddigiekben, első közelítésben azt tételeztük fel, hogy mindkét komponens homogén populációt reprezentál. A biológiai membránokon kapott későbbi kísérleti eredmények azonban arról győzték meg minket, hogy az igaz, hogy a *transz* szegmensek populációja homogén, mert valami csak egyféleképpen lehet rendezett, nevezzük is őket ezután rendezett szegmenseknek, de ez már nem igaz az eddigiekben *gauche* szegmensekhez rendelt populációra. A *gauche* – ezután rendezetlennek hívott – populációnak van egy eloszlása, és ez az eloszlás a növekvő hőmérséklettel növekvő frekvenciájú sávval jellemezhető. Ezt a „második közelítést” ki is fogjuk használni a biológiai problémák vizsgálatában.



7. ábra: A mért és az illesztett spektrumok közti különbség a $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ sáv tartományában, dohány tilakoid membránban.

Az egy-komponenses, illetve a két-komponenses $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ sáv illesztés hibája:

Ha meg akarjuk tudni, hogy mikor elegendő a hagyományos, egy Lorentz komponenssel való illesztést használni, és mikor kell két komponenst illeszteni, akkor szemügyre kell vennünk az illesztések hibáját, illetve e hiba hőmérsékletfüggését, hiszen vizsgálatainkban általában a hőmérséklet volt az a paraméter, aminek függvényében a membránszerkezet változásait vizsgáltuk. A hiba induló értékét 5 °C-nál egy-komponenses illesztésnél az [5.A. ábra](#), két-komponensesnél az [5.B. ábra](#) mutatja.

A hiba hőmérsékletfüggését a $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ sáv tartományában a [7. ábrán](#) ábrázoltam. Szembetűnő, hogy az egy komponensű illesztés hibája a hőmérséklet növekedésével fokozatosan eltűnik, azaz magasabb hőmérsékleteken (vagy nagyon rendezetlen, sok telítetlen zsírsavat tartalmazó membránokban) megfelelő lehet az egy komponenssel

való illesztés is. A hiba alakja ugyanakkor megerősíti korábbi, SVD analízisre alapozott következtetésünket, hogy itt valóban két sávról van szó. A rendezett szegmensekhez tartozó sáv a hőmérséklet növekedésével fokozatosan eltűnik, ezután már csak a többé-kevésbé eloszlott rendezetlen szegmenseket reprezentáló sávval kell számolnunk. Ennek megfelelően, a két-komponenses illesztés hibája az egész hőmérséklet tartományban minimális ([7. ábra](#)).

Az amid I sáv komponenseinek meghatározása. (Saját eredmény [[S2](#)])

Az Irodalmi áttekintésben részletesen tárgyaltam, milyen problémákkal kell szembenézni, amikor meg akarjuk határozni, hogy a fehérje infravörös spektrumának amid I sávjában hol helyezkednek el a másodlagos szerkezeti elemekre jellemző komponensek. A következtetés az volt, hogy akár második deriválttal, akár Fourier ön-dekonvolúcióval akarjuk meghatározni a komponensek számát és helyét, igen jó jel/zaj viszonyra van szükségünk, és a lehető legkisebbre kell csökkentenünk a vízgőz forgási spektrumából származó hozzájárulást.

A vízgőz zavaró jelének lecsökkentésére különböző eljárásokat követnek. Egy radikális megoldás, amit Fritz Siebert alkalmaz Freiburgban, hogy az egész spektrométert, mintástól vákuumban tartja, de sok mintával ezt nem lehet megtenni. Egy másik megközelítést jelent, hogy ma már több gyártó kínál olyan spektrométereket, amelyeknek interferométer részében állandóan vákuum van, így csak a mintatartó részt kell a vízgőztől mentesíteni. Egy további lehetőség, hogy a lezárt mintatérben ki-be toljuk a mintát a fényútba, így a háttér és a minta mérése között minimális lesz a vízgőz hozzájárulásának változása, ami végül is az abszorpciós spektrumban megjelenik. Sajnos ATR kísérletek esetében ez a módszer nem, vagy csak igen speciális felszereléssel és csak bizonyos esetekben (61) valósítható meg.

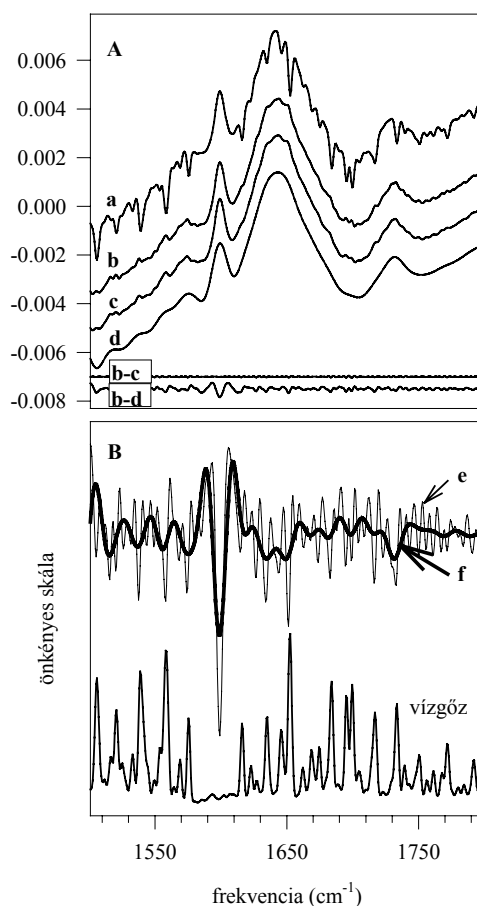
A vízgőz levonására javasolt eljárásunkat az alábbiakban egy extrém eseten vezetem végig, hogy jobban látható legyen, mire képes. Ennél egy általános esetben csak jobb eredményt lehet elérni.

A polielektrolit filmekre²⁹ adszorbeáltatott fehérjék szerkezetének meghatározásakor halmozottan nehéz a fenti feltételek teljesítése. Az adszorbeálódott fehérje mennyisége igen csekély, az amid I tartományban általában csak néhányszor 10^{-3} OD-jű spektrumokat kapunk, azaz a nagyon magas jel/zaj viszonyú spektrum nincs meg, és nem is elérhető. A következő nehézség, hogy a filmek felépítése sokáig tart, így időben nagyon messze (akár több napnyi távolságra) kerül egymástól a háttér spektrumok és a minta spektrumainak felvétele [S2]. Ennyi idő alatt pedig elkerülhetetlenül változik a vízgőz szintje, a leggondosabb száraz levegő, vagy nitrogén befűvés mellett is.

Ezekon a nehézségeken úgy próbáltunk meg úrrá lenni, hogy a mért spektrumokból amennyire csak lehetett, levontuk a vízgőz hozzájárulást (8. ábra). Ezzel teljesen az általános gyakorlatot követtük. Az általános gyakorlat következő lépése mindig egy valamilyen polinomos simítási procedúra. Ezt én kockázatosnak tartom, mert a vízgőz spektruma igencsak változó intenzitású csúcsokból áll (8.B. ábra), aminek következtében ugyanaz a polinom nagyon eltérő görbét hagy maga után ott, ahol kicsi az egymás utáni vízgőz csúcsok közti különbség, mint ott, ahol nagy. Ezt be is mutatom a 8.A. ábrán. A vízgőz levonása után kapott **b** spektrum és a polinommal simított **c** spektrum különbsége (**b-c**) alig mutat zajt, azaz a **b** spektrumban a vízgőz interaktív (szabad szemmel történő) levonása után megmaradt vízgőz csúcsokban nem tett nagy kárt a polinomos simítás. Ez jól látszik a **c** spektrum második deriváltján is, ami annak ellenére igen zajos, hogy a deriválás során további simítást alkalmaztunk (8.B. ábra, e görbe). Ami még rosszabb, az az, hogy az **e** görbe minimumai egybeesnek a vízgőz spektrum sávjaival. Ez volt az a hiba, amibe az Irodalmi áttekintésben diszkutált munka szerzői beleestek (I. táblázat).

²⁹ A legutóbbi időkben, spektroszkópiai ismereteinket egy gyakorlati alkalmazásra is számot tartó terület, az ún. bio-anyagok (biomaterials) vizsgálatában kezdtük el hasznosítani. Ezek az anyagok képesek reagálni a biológiai környezet hatásaira, lehet belőlük olyan konstrukciókat kialakítani, amelyek belsejében gyógyszerek vannak, amelyek ellenőrzött módon képesek kiiffundálni a célzott környezetbe, képesek enzimeket működtetni, poliszaharidokat utánozni, fázisátalakulásokat produkálni, ahogy a helyzet megkívánja. Hordozóanyaguk leggyakrabban valamilyen polielektrolit film, amibe a molekulákat előre megtervezett módon, rétegenként lehet bevinni. Ezek a szerkezetek szinte kínálják magukat a teljes visszaverődésen alapuló Fourier transzformációs infravörös (ATR-FTIR) spektroszkópia számára, aminek révén érdekes eredményeket is kaptunk (62).

A **b-c** spektrummal ellentétben, a **b** spektrum és a **b** spektrum Fourier simításával kapott **d** spektrum **b-d** különbsége igencsak tele van kisebb-nagyobb „szőrökkel”. Azaz, a Fourier simítás sokkal erőteljesebb volt, és zajtól szabadított meg minket.



8. ábra: A vízgőz „kitisztítása” a fehérje spektrumából³⁰. A: (a) A nyers spektrum. (b) A vízgőz spektrumának interaktív módon való levonása után kapott spektrum. (c) A spektrum, amit a hagyományok szerinti 9 pontos Savitzky-Golay féle simítással kapunk. (d) A spektrum, amit a b spektrum Fourier simításával kaptunk. (b-c) A látszólag vízgőz mentesített b spektrum és a Savitzky-Golay simítással tovább „javított” c spektrum különbsége. (b-d) A látszólag vízgőz mentesített b spektrum és a b spektrumából Fourier simítással kapott d spektrum különbsége. B: (e) A Savitzky-Golay simítással kapott c spektrum második deriváltja, amit a deriválás során alkalmazott további 5 pontos Savitzky-Golay simítással kaptunk. (f) A Fourier-simított d spektrum második deriváltja, bármiféle további simítás alkalmazása nélkül. Az ábra alján a vízgőz spektrumát mutatom be.

³⁰ Itt szándékosan a mérések során tapasztalt legrosszabb esetet vettük elő. A fehérje minta polielektrolit fim felszínére adszorbeáltatott fibrinogén volt. Figyeljük meg, mennyire kicsi volt az amid I sáv abszorpciójának értéke.

Itt meg kell állni egy pillanatra és megmagyarázni, hogy csináljuk a Fourier simítást:

Elvégezzük a Fourier transzformációt a kiválasztott spektrumon, és így kapunk egy valós és egy képzetes transzformáltat.

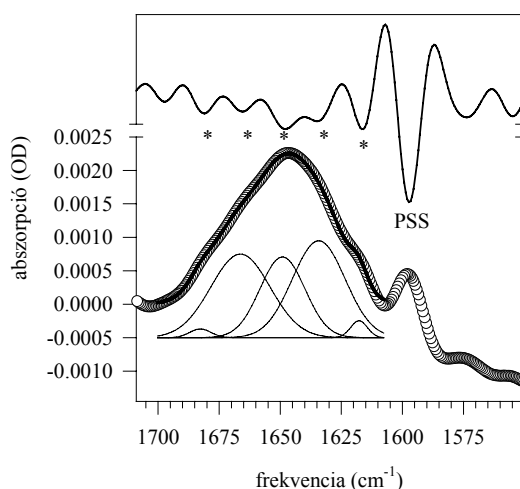
Ezeket a transzformáltakat megszorozzuk egy apodizáló függvénnyel. Az apodizáló függvény értéke 1 és 0 között változik, az 1 és 0 közötti átmenet alakját és helyét paraméterként használjuk. Esetünkben egy Gauss „félkörbe” volt az átmenet alakja, ha ezt közelebb húztuk az origóhoz, akkor erősebb simítást kaptunk, ha távolabb eresztettük, akkor enyhébbet. Tudtuk változtatni a Gauss félkörbe szélességét is. Az apodizáló függvénynek az a szerepe, hogy kivágja a spektrumból a nagyfrekvenciájú zajokat. Ez különösen ott eredményes, ahol a zaj frekvenciája határozottan elkülönül a mérendő jelétől. A vízgőz esete pontosan ilyen, hiszen a vízgőz sávok szélessége $2-3\text{ cm}^{-1}$, az egész amid I sáv pedig $60-70\text{ cm}^{-1}$. Az apodizáció természetesen mindig okoz valamilyen torzulást a széles amid I sávban is. De ez a torzulás egyrészt ellenőrizhető, hiszen amíg nem jelenik meg lényeges, hosszú távú eltérés a nulla körüli vízszintes egyenestől a **b-d** különbségi spektrumban ([8. ábra](#)), addig nem okoztunk jelentős torzulást. Másrészt a torzulás az egész amid I sávot együtt érinti³¹, így lokális hatása a később meghatározandó amid I komponensekre kicsi és egyforma lesz, ellentétben a polinomos simítások lokálisan igencsak változó hatásával.

Elvégezzük az inverz Fourier transzformációt.

Ha ezután megnézzük az amid I sáv második deriváltját, az **f** görbét ([8.B. ábra](#)), akkor láthatjuk, hogy az „szép sima”, egyrészt kevesebb minimuma van, mint az **e** görbének, másrészt ezek a minimumok nem esnek egybe a vízgőz spektrum sávjaival.

A Fourier simítás után kapott második derivált görbe minimumainak számát és frekvenciáját használva az amid I sáv illesztésekor megadandó komponensek kezdőértékeiként, nagyon jó illesztést lehetett kapni, az optimálisnak talált

³¹ A kisebb szélességű sávok esetében fellépő torzulást jól lehet látni az 1600 cm^{-1} táján levő, a polielektrolit filmből származó csúcson. Ekörül a csúcs körül a Fourier simítás következtében fellépő kiszélesedés eredménye meglátszik a **b-d** spektrumon ([8.A. ábra](#)).



9. ábra: Polielektrolit film felszínére adszorbeált fibrinogén (61 C°-on mért) amid I sávjának felbontása Fourier simítás után kapott második derivált által kijelölt kezdő paraméterekkel. A legfelső görbe a Fouries simítás után kapott második derivált (ugyanaz, mint az [f görbe a 8. ábrán](#)). A csillagok jelölik azokat a minimumokat, amiket mint frekvencia kezdőértékeket felhasználtunk a komponens sávok meghatározásához. A körökkel felrajzolt spektrum a fibrinogén eredeti spektruma, az alatta levő komponensekből származó illesztett görbe a körök belsejében fut. PSS jelöli a polielektrolit film egyik komponenséből származó sávot.

komponensek frekvenciái csak 1-2 hullámszámmal tértek el a kezdőértékektől. Az illesztés utolsó lépései teljesen szabadjára engedett paraméterekkel történtek ([9. ábra](#)).

Úgy gondolom, hogy ez az eljárás meggyőzően bizonyítja, hogy meg lehet szabadulni a vízgőz sávok zavaró hatásától a fehérjék infravörös spektrumának kiértékelése során.

EREDMÉNYEK ÉS DISZKUSSZIÓ

Biológiai problémák

FOTOSZINTETIZÁLÓ SZERVEZETEK HŐMÉRSÉKLET ADAPTÁCIÓJÁNAK VIZSGÁLATA

A membránlipidek telítetlenségének szerepe cianobaktériumokban [S3]

Előzmények

Mint azt az Irodalmi áttekintésben röviden említettem, a membránok igen finoman kiegyensúlyozott lipid-fehérje együttesek, amiknek többféle funkciója van az élő szervezetekben. Egyrészt elválasztják egymástól a sejteket, az egyes sejtalkotórészeket, hatásként elzárkózást biztosítva számukra a környezetüktől. Másrészt, biztosítaniuk kell a megfelelő passzív/aktív anyagcserét a külvilággal. Ezen kívül, a membránnak közvetítenie kell a sejtnél a külvilágból érkező behatásokat, jelzéseket is. Ez teszi lehetővé, hogy a sejtek alkalmazkodni tudjanak az állandóan változó külső körülményekhez. Ezért aztán a biológiai membránnak egy fizikailag eléggé erős, de mégis dinamikus valaminek kell lennie, amiben a környezeti határok között egyrészt egyensúlyban vannak egymással saját komponensei, másrészt ő, mint egység, a környezetével.

Mi a hőmérséklethez, az egyik leggyakrabban változó környezeti paraméterhez való alkalmazkodás folyamatát vizsgáltuk cianobaktériumokban és magasabb rendű növényekben. Miről is van szó?

Egyes cianobaktériumokban a növekedési hőmérséklet meghatározza a glicerolipidek zsírsavláncaiban a telítetlenség³² mértékét. Mégpedig úgy, hogy minél alacsonyabb a növekedési hőmérséklet, annál több a telítetlen zsírsav a glicerolipidekben. A lipidek biokémiai és biofizikai sajátosságai függenek zsírsavláncaik telítetlenségének mértékétől, így aztán a zsírsav telítetlenségnek nagy hatása van a membránok működésére (63). Az az általános tapasztalat, hogy minden biológiai membránban - a számára fiziológiai szempontból releváns hőmérséklet tartományban - a lipideknek folyadékkristályos állapotban kell lenniük. Modell membránokon végzett vizsgálatokból egyértelműen kiderült, hogy a gél→folyadékkristályos fázisátmenet hőmérséklete függ a membránlipidek telítetlenségének mértékétől (64). Ennek következtében azután a biológiai membránok fiziológiai aktivitása is drasztikusan megváltozik a gél→folyadékkristályos fázisátmenet környékén (65). A fotoszintetikus membránokban is a zsírsav telítetlenség mértéke határozza meg az acil-lipidek fázisviszonyait, amit zsírsav deszaturáz enzimek (66) állítanak be, a zsírsavláncokon kialakított kettős kötésekkel. Hogy a deszaturáció tényleg a hőmérséklethez való alkalmazkodás egyik kulcsa, azt az is mutatja, hogy a deszaturáz aktivitás szintje együtt változik a külső hőmérséklettel, például az alacsony hőmérsékleti tolerancia kialakításakor (67).

A *Synechocystis* PCC6803 egy transzformálható cianobaktérium törzs, amit széleskörűen használnak, mint a magasabb rendű növények kloroplasztizának modelljét. A mezofil *Synechocystis* PCC6803 kb. 25-35 °C hőmérséklet tartományban szeret élni, de ezen a tartományon belül is alkalmazkodik az aktuális külső hőmérséklethez. Mégpedig úgy, hogy deszaturáz enzimsziszteme (68) segítségével mindig az optimális szintre állítja be a membrán lipidek zsírsavjainak telítetlenségét (69). A sejtek deszaturáz enzimsziszteme azonban mutagenézissel megváltoztatható, és mi célul tűztük ki azoknak a változásoknak a membránszerkezetre, ezen belül a fehérjékre, illetve a lipidekre gyakorolt hatását, amik a hőmérséklet és/vagy a deszaturáció szintjének megváltozása következtében

³² *Ab ovo* minden zsírsavlánc telítetlen, azonban az elongáció során, azaz mire teljesen elkészülnek, a láncok telítődnek. A környezetből érkező jelzések hatására, a szükség szerinti telítetlenség úgy alakul ki a zsírsavláncokban, hogy a zsírsav deszaturáz enzim rendszer valamely eleme(i) kettős kötések kialakítanak ki benne. Mivel ez a telítetlenség az eltérés az alaphelyzettől, mindig ezzel a szóval fogom jellemezni a membrán lipideket, nem hol telítettség, hol telítetlenséggel.

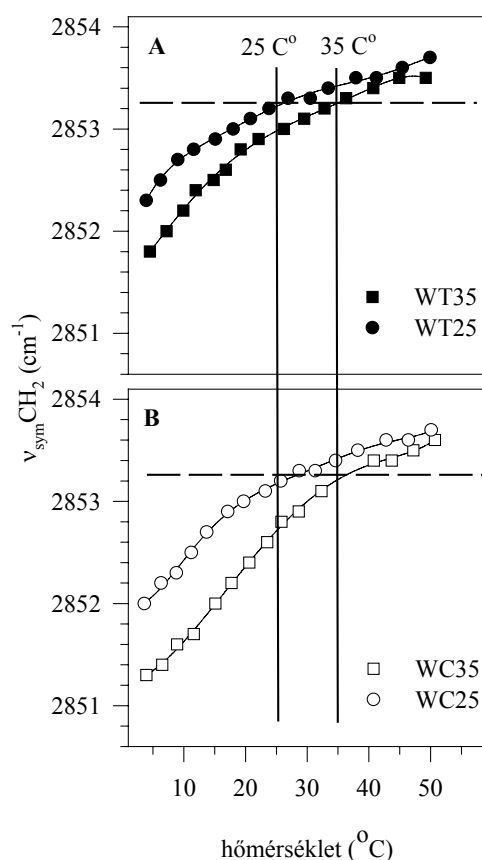
lépnek fel. Ezért 25, illetve 35 °C-on vad típusú és olyan mutáns sejteket neveltünk, amelyekben csak telített és egyszeresen telítetlen zsírsavak maradtak.³³ (Azaz, a 2-, 3-, 4-szeresen telített zsírsavakat létrehozó deszaturáz enzimeket inaktiváltuk a sejtekben.)

Van ennek a rendszernek egy „ellenpróbája” is, amit az értekezés írásával párhuzamosan végzünk, ezért annak eredményeit itt még nem tudom bemutatni, de a teljesség kedvéért röviden, hogy miről is van szó. Egy másik cianobaktérium, a *Synechococcus* PCC7942 (korábban *Anacystis nidulans* R2), aminek fiziológiás hőmérséklettartománya ugyan pár fokkal el van tolva felfele, a fentebb tárgyalt *Synechocystis*-hez viszonyítva, de csak egyszeresen telítetlen olajsavat tartalmaz. Ha egy ilyen baktériumba beépítjük egy második kettős kötés létrehozására képes deszaturáz enzim *desA* génjét, akkor felkínáljuk a lehetőséget a sejtnak, hogy - elsősorban alacsony hőmérsékleten - éljen a plusz kettőskötés adta membrándinamika növeléssel. Ez azért nagyon érdekes probléma, mert minden eddigi esetben valamilyen megszorítást jelentett a membránlipidek zsírsavösszetételének megváltoztatása, lett legyen szó a fentebb tárgyalt genetikai módszerekről, vagy vízóldékony katalizátorok alkalmazásáról (71).

A vad típusú Synechocystis PCC6803 sejtek membrán lipidjei:

Ha a korábban bemutatottak szerint felvesszük 35, illetve 25 °C-on nevelt, vad típusú *Synechocystis* PCC6803 tilakoid és citoplazma membránjának infravörös spektrumát, a spektrum 3050-2800 cm⁻¹ közötti részét a hőmérséklet függvényében felvett minden egyes spektrumban felbontjuk komponenseire, úgy ahogy az [5.A. ábra](#) mutatja, és a hőmérséklet függvényében ábrázoljuk a kapott $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ frekvencia értékeket, akkor a [10. ábrán](#) látható eredményhez jutunk. Mármint akkor, ha egy komponenssel illesztjük a $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ sávot. Ezt azért tehettük meg, mert, mint

³³ A *Synechocystis* PCC6803 deszaturáz rendszerének leírása, a célzott mutagenézis eljárása, és hatása részletesen megtalálható Tasaka és mtsai. közleményében (69;70).



10. ábra: A $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ rezgés hőmérsékletfüggése 35 illetve 25 C°-on nőtt Synechocystis PCC 6803 sejtek (A) - tilakoid (WT35, WT25)³⁴ és (B) - citoplazma membránjában (WC35, WC25). A függőleges vonalak a növekedési hőmérsékleteket jelölik. Vegyük észre, hogy a zsírsavláncok rendezetlensége az adott sejtek növekedési hőmérsékletén azonos. Ezt az értéket a vízszintes szaggatott vonal jelöli.³⁵

látni fogjuk, a különbségek az egyes membránok között olyan nagyok, hogy teljesen megfelelő volt az egy-komponenses illesztés is.

A [10. ábra](#) görbéin két érdekesség van. Az egyik az, hogy a 25 C°-on nőtt sejtekhez tartozó görbék alacsonyabb hőmérsékleten „törnek le”, azaz alacsonyabb hőmérsékletig megőrzik a nagyobb lipid rendezetlenséget (a több rendezetlen

³⁴ Mindenütt megtartottam a megfelelő közlemény angol rövidítését, hogy az itt tárgyaltak könnyebben összevethetőek, kiegészíthetőek legyenek a cikkekben leírtakkal.

³⁵ Gyakran felmerül, hogy mekkora az ilyen frekvencia meghatározás hibája. A hiba természetesen függ az illesztés pontosságától. Ebben a spektrum tartományban az SPSERV program által megadott hiba 0.1 cm⁻¹-nél kisebb volt. De a mérés bizonytalanságát a görbéken egymás után következő pontok „oszillálásából” (ami igen kicsiny) is megbecsülhetjük.

szegmenst). A másik érdekesség, az, hogy mind a 25 C°-on, mind a 35 C°-on nőtt sejtek membránjainak rendezetlensége nagyjából azonos a növekedési hőmérsékletükön. Ezt az azonos rendezetlenségi értéket jelöli a vízszintes szaggatott vonal mindkét panelben.

Az első érdekesség annak a következménye, hogy a sejtek a növekedési hőmérséklethez igazítják membrán lipidjeik telítettségének szintjét. A [10. ábra](#) görbéi az alacsonyabbtól a magasabb hőmérséklet felé haladva, egy gél→folyadékkristályos fázisátmenetet tükröznek. Ez az átmenet a sokféle lipid és a membránban jelenlevő fehérjék miatt nem olyan szép éles, mint amit a [2. ábrán](#) mutattam, és, mivel nem akartuk a mintákat megfagyasztani, többé-kevésbé hiányzik a fázisátmenet alacsony hőmérsékletű része is.

Ha megvizsgáljuk a 25 C°-on, illetve 35 C°-on nevelt sejtek lipidjeinek zsírsavösszetételét, kiderül, hogy az nem egyforma. A 25 C°-on nevelt sejtekben több a telítetlen zsírsav, pontosabban tartalmazznak olyan, többszörösen telítetlen zsírsavakat is, amik a 35 C°-on nevelt sejtekből hiányoznak ([IV. táblázat](#)). Azaz, a több, telítetlen („olajszerű”) zsírsav alacsonyabb hőmérsékleteken is képes rendezetlen („fluid”)³⁶ állapotban maradni, így alacsonyabb hőmérsékleteken is fenn tud maradni a különböző membránfunkciókhoz szükséges homeosztázis. A [IV. táblázatban](#) feltüntettem egy irodalmi adatot is, a 22 C°-on nevelt sejtek teljes lipid összetételét (69), ami a tilakoid és a citoplazma membrán arányát figyelembe véve, gyakorlatilag a tilakoid membránnak felel meg. Az jól látszik, hogy itt, közeledve a fiziológiai hőmérséklettartomány alsó határához, meredeken emelkedik a többszörösen telítetlen zsírsavak mennyisége.

A [10. ábra](#) másik érdekessége, az eltérő nevelési hőmérsékletekhez tartozó azonos membrándinamika, a „homeoviszkozus adaptáció” (72) jelenségéhez kapcsolható, annak tudtommal egyetlen infravörös spektroszkópiai bizonyítéka. A

³⁶ A fluiditás kifejezést gyakran használják a membrán lipidekkel kapcsolatban, de nagyon sokszor nincsenek meg azok a feltételek, amik egy ilyen makroszkópikus paraméter értelmezését lehetővé tennék. Semmi esetre nincsenek meg az infravörös spektroszkópiai adatok tekintetében, amikhez minden egyes C-H kötés egyenként hozzájárul, ezért végül a konformációs eloszlás átlagát látjuk, így esetünkben nincs értelme fluiditásról, (mikro)viszkozitásról beszélni.

homeoviszkozus adaptáció azt jelenti, hogy minden hőmérsékleten, ahol a sejtek nőni képesek, igyekeznek azonossá tenni „Singer-Nicholson membránjaik”

viszkozitását.³⁷

IV. táblázat: Vad típusú *Synechocystis* PCC 6803 sejtek citoplazma és tilakoid membránjainak zsírsav összetétele 25 C°-on, illetve 35 C°-on való nevelés esetén

	Zsírsav összetétel (rel. %)							
	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	γ -18:3	α -18:3	18:4
WC25	56	4		8	12	12	5	3
WC35	57	4	1	8	13	16		
WT25	52	4	1	8	10	15	6	4
WT35	55	3	1	7	10	24		
*VS22	51	3		2	6	8	21	8

WC25, WC35 – vad típusú citoplazma membránok 25, illetve 35 C°-on nőtt sejtekből.

WT25, WT35 – tilakoid membránok ugyanezen sejtekből

*VS22 – Teljes lipid kivonat 22 C°-on nőtt vad típusú sejtekből (69).

Ha már itt együtt szerepelt azonos membrándinamika és homeoviszkozus adaptáció, akkor érdemes lenne tisztáznom, mit értek az egyiken, mit a másikon:

Membrándinamika alatt főként az infravörös spektrum által nyújtott információk alapján kapott képet értem. Ugyanakkor be kell vallanom, hogy az infravörös spektrum lipidek jellemzésére használt $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ frekvenciája nem a molekulák dinamikáját méri közvetlenül. Az általa adott információ, a zsírsavláncok konformációs heterogenitása, azonban általában szoros korrelációban van a molekulák dinamikájával. Eszerint a lipidek zsírsavláncai alacsony hőmérsékleten kevésbé, magasabb hőmérsékleteken jobban „töredezetek”, azaz több bennük a *gauche* szegmens. Az ilyen szegmensek kialakulását megkönnyíti, ha a zsírsavláncok

³⁷ A homeoviszkozus kifejezés szintén makroszkópikus paraméterre utal, de tekintettel arra, hogy ezeket az adatokat elsősorban spinjelölt ESR spektroszkópiával kapták, ahol a közegben mozgó spinjelölt molekula forgási diffúziós állandóját mérik, némi makroszkópikus analógiának van alapja.

térbeli „pakolása” nem tökéletes, amit leginkább a láncokban megjelenő *cisz* konfigurációju kettős kötések okozhatnak. Nagyobbnak tekintem a membrándinamikát, ha több benne a rendezetlen, tört zsírsavlánc. A zsírsavláncok konformációs heterogenitásának van egy, a fehérjéket érintő része is. Megfigyelhető, hogy a membránlipidek infravörös spektruma olyan magas $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ frekvenciákat mutat olyan alacsony hőmérsékleteken is, ahol a lipideknek gél állapotban kéne lenniük, amik csak úgy magyarázhatók meg, ha ott is vannak tört zsírsavláncok (ezt majd részletesen bemutatom a fehérje/lipid arányról szóló fejezetben). Tört zsírsavláncoknak pedig azért kell lenniük minden hőmérsékleten, ahol a sejtek megélnék, mert ki kell alakulnia a megfelelően záródó lipid-fehérje határfelületnek. De ez nem jelenti, hogy ezeknek a lipideknek nagymértékben töredezett zsírsavláncaik következtében nagy lenne a dinamikája. Ezért érdekes, hogy a növekedési hőmérsékleteken azonos volt a $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ infravörös paraméter értéke, ami azonos, vagy nagyon hasonló konformációs heterogenitást jelent.

Ezzel szemben, a homeoviszkozus adaptáció eddigi vizsgálataiban a viszkozitást (fluiditást), azaz egy makroszkópikus paramétert, elsősorban jelölő spektroszkópiákkal (ESR, fluoreszcencia anizotrópia) mérték, ahol nagyméretű, jelölt molekulák mozgását vizsgálták a membránok lipid fázisában. Tehát ezekben a mérésekben csak a lipidekről van szó³⁸. Ettől még ezek az eredmények igazak, de csak annyira, amennyire a „Singer-Nicholson membránok” megfelelnek a biológiai membránoknak. Vannak, amelyeknek megfelelnek, azoknak, amelyekben alacsony a fehérjék mennyisége és sok a lipid (és valóban a homeoviszkozus adaptációról szóló eredmények ilyen membránokon születtek). Ezeknek a membránoknak a tekintetében azonos eredményt fog adni a viszkozitás mérése és az infravörös spektroszkópia. De ellentmondások lesznek a kétféle megközelítésből származó következtetések között, mint azt lejjebb látni is fogjuk, ha magas a fehérje/lipid arány a vizsgált membránban.

³⁸ Van persze olyan ESR módszer is, amelyik meg tudja mutatni a fehérjékhez kötött lipideket is, ezzel egyik lejjebb bemutatandó vizsgálatukban mi is éltünk, de nem ezt a módszert használták a homeoviszkozus adaptációs vizsgálatokban.

Ezek szerint az infravörös spektroszkópia mérések tekintetében a homeoviszkozus adaptáció helyett a homeodinamikus adaptáció kifejezés lenne a helyes.

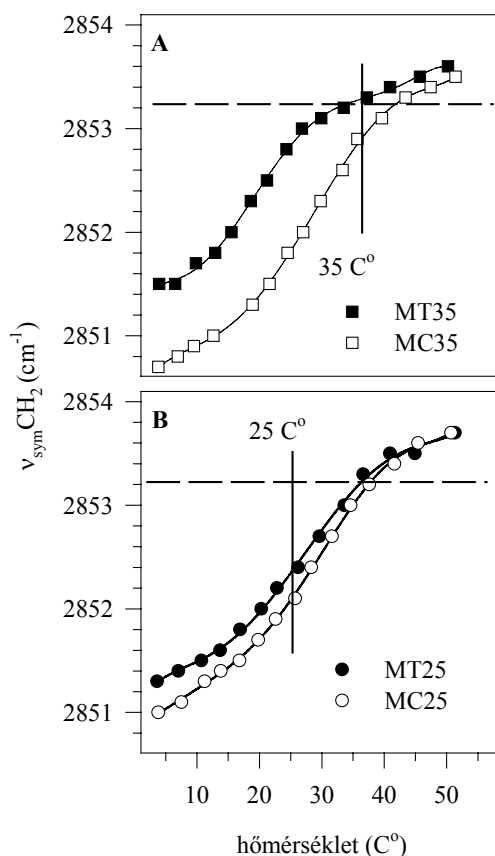
Egy-egy membrán még egy adott hőmérsékleten való jellemzéséhez is nagyon hasznos egy nagyobb hőmérséklet tartományban felvenni az infravörös spektrumokat. A hőmérséklet, mint külső paraméter mentén sokkal jobban értelmezhetők az egyes membránok közti esetleges különbségek. A homeoviszkozus adaptáció esetében a természet arra törekszik, hogy azonos membrán dinamikát állítson be különböző hőmérsékleteken, amihez egymástól eltérő zsírsavösszetételre van szüksége. Az eltérő zsírsavösszetétel hatása a membrándinamikára csak egy szélesebb hőmérséklet tartományban derül ki. Általában elmondhatjuk, hogy minden olyan módszernek, ami azt állítja magáról, hogy a membránok lipidjeiről, a membrán dinamikáról tudósít, meg kell felelnie annak a feltételnek, hogy az általa két különböző membrán között mért különbségnek nagyobbaknak kell lennie alacsonyabb, mint magasabb hőmérsékleteken³⁹.

Membránlipidek mutáns *Synechocystis* PCC6803 sejtekben:

A lipid telítetlenségnek a membrán szerkezetre gyakorolt hatásának vizsgálatához egy olyan mutáns törzset használtunk, amit inzerciós mutagenézissel kaptak. Ebben a *desA*⁻/*desD*⁻-nak nevezett törzsben a Δ^{12} és Δ^6 deszaturázokat kódoló *desA* és *desD* géneket inaktiválták egy antibiotikum rezisztenciát hordozó génnel, amit a megfelelő deszaturáz génjébe építettek be (73). Így, a *desA*⁻/*desD*⁻ sejtekben az olajsav maradt az egyetlen telítetlen zsírsav, a sejteknek ezt kell kombinálniuk különböző telített zsírsavakkal a membrán lipidekben, hogy szabályozzák membránjaik dinamikus tulajdonságait.

³⁹ Egészen hétköznapi példával élve, a zsír és az olaj között, amikor húst sütünk bennük, kisebb a különbség, mindkettő folyik, talán a szaguk más csak, mint alacsony hőmérsékleten, ahol az egyik már szilárd, amikor a másik még folyékony. A membránokban is a „zsírszerű” és „olajszerű” zsírsav láncok arányának megváltoztatása jelenti az adaptációt, ezért kell alacsony hőmérsékleteken nagyobb különbséget kapnunk két különböző membrán között, mint magas hőmérsékleteken.

A 25, illetve 35 C°-on nőtt mutáns sejtek membránjai $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ rezgésének hőmérsékletfüggését a [11. ábra](#) mutatja. Ha ezeknek a membránoknak a hőmérsékletfüggését összehasonlítjuk a vad típusú sejtek membránjaiéval ([10. ábra](#)), akkor szembetűnő, hogy míg a 35 C°-on nevelt mutáns sejtek tilakoid (MT35) és citoplazma (MC35) membránjai képesek a vad típuséhoz hasonló lipid rendezetlenség fenntartására növekedési hőmérsékletük, a 35 C° környezetében, a 25 C°-on nőtt sejtek MT25 és MC25 membránjai erre képtelenek.



11. ábra: A $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ frekvencia hőmérsékletfüggése 35, illetve 25 C°-on nevelt desA⁻/desD⁻ mutáns (M) sejtekből preparált tilakoid (T) és citoplazma (C) membránokban. A szaggatott vonal azt a lipid rendezetlenséget jelöli, amit a vad típusú sejtekben a növekedési hőmérsékleteknél találtunk.

Ehhez még hozzá kell tennünk, hogy 25 C°-on a mutáns sejtek osztódási sebessége elmarad a vad típusétól, és hogy a mutáns sejtek már nem is osztódnak ez alatt a hőmérséklet alatt (74). Ezenkívül, alacsony hőmérsékleten a mutáns sejtek nagyon érzékenyek a fényre (a részleteket lásd az (75;76) közleményekben). Az

alacsony hőmérsékleti fotoinhibíció jelenségét, ami a fényérzékenységet jelenti, az okozza, hogy megakad a D1 fehérje regenerációja a mutáns sejtekben, és különösen alacsony hőmérsékleten. A D1 a II-es fotoszisztéma reakciócentrumának egyik fehérjéje, aminek folyamatos „elromlása” és a rossz fehérjék újakkal való pótlása minden fotoszintetikus organizmusban a normális élet része. Az már korábban is feltűnt, hogy a többszörösen telítetlen zsírsavak jelenléte elengedhetetlenül szükséges a D1 fehérjék működésre képes formában való regenerálásához a 25 °C-on nőtt *desA⁻/desD⁻* sejtekben (77). A sejtek ugyanis képesek voltak új pre-D1 fehérjék szintézisére, a tilakoid membránhoz való eljuttatására, de a fotoszintézis szempontjából inaktív pre-D1 fehérje aktív D1 fehérjévé való érése a membránokban már nem tudott végbemenni.

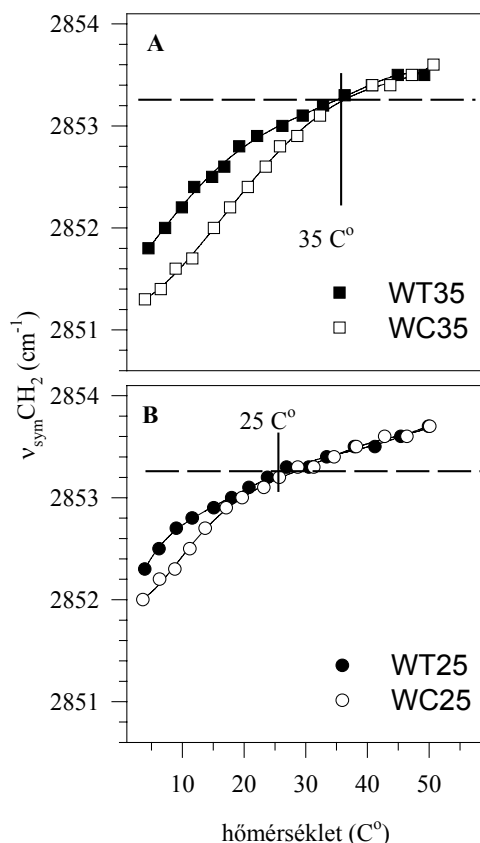
Ehhez a korábban pusztán biokémiai megfigyeléshez szolgáltatnak szerkezeti magyarázatot az infravörös spektroszkópia révén tett membrándinamikai megfigyelések. Ha összevetjük a fenti membrándinamikai adatokat, az alacsony hőmérsékleti fotoinhibíciós kísérletek eredményét, és a *desA⁻/desD⁻* sejtek alacsony hőmérsékleten való osztódási nehézségeit, akkor arra a következtetésre juthatunk, hogy az MT25 és MC25 membránok 25 °C-on „dinamikai határukon” működnek. Ha bármi, mint például az elromlott D1 fehérje kicserélése egy újra, nagyobb helyi membrán átrendeződést kívánna meg, arra ezeknek a membránoknak már nincs semmilyen „dinamikai tartaléka”.

A fehérje/lipid arányok

Van egy további érdekessége a *Synechocystis* sejtek membránjain végzett infravörös méréseknek, ami akkor látszik jobban, ha páronként egymás mellé tesszük az egy növekedési hőmérséklethez tartozó tilakoid és citoplazma membránok görbéit. Ez a mutáns sejtekre már így van a [11. ábrán](#), a vad típusú sejtekre újrarajzoltuk a [12. ábrán](#).

A [11.](#) és [12. ábrán](#) az látszik (ez utóbbin tisztábban), hogy mindkét hőmérsékleten való növekedés esetében, a növekedési hőmérsékleten, és attól fölfele, a tilakoid és a citoplazma membránok $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ frekvenciájának hőmérsékletfüggése

nagyon hasonló. Ezzel szemben, a növekedési hőmérséklet alatt a citoplazma membránok mindenütt rendezettebbek (alacsonyabb a $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ frekvenciájuk), mint a tilakoid membránok.



12. ábra: **A** - A $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ frekvencia hőmérsékletfüggése 35 $^{\circ}\text{C}$ -on nőtt vad típusú *Synechocystis* PCC6803 sejtek tilakoid (WT35) és citoplazma (WC35) membránjában. **B** – 25 $^{\circ}\text{C}$ -on nőtt sejtek tilakoid (WT25) és citoplazma (WC25) membránjában

Ez a különbség nem nagyon vezethető vissza egy sejt tilakoid és citoplazma membránjának esetleg eltérő zsírsavösszetételére, mert az igen hasonló ([IV. táblázat](#)).

Ez az infravörös spektroszkópai eredmény, miszerint a citoplazma membránok zsírsavláncai azonos hőmérsékleteken rendezettebbek lennének a tilakoid membránoknál, látszólag ellentmond korábbi ESR spektroszkópai megfigyeléseknek, amik azt mutatták, hogy a plazmamembránok fázisátmenete alacsonyabb hőmérsékleten van, mint a tilakoid membránoké (78).

Az eredmények megfelelő értelmezéséhez figyelembe kell vennünk, hogy a kétféle membránban nagyon eltérő a fehérje/lipid arány. Ezt az arányt, pontosabban ennek megváltozását szerencsére meg lehet állapítani az infravörös spektrumból. Ugyanis, a fehérjékre jellemző, $1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ közötti amid I sáv mellett, $1720\text{-}1745\text{ cm}^{-1}$ körül van a zsírsavaknak a lipidek glicerín vázával kialakított észter kötésének $\text{C}=\text{O}$ rezgése. Ilyen kötések csak a lipidekben vannak⁴⁰. Ezért az amid I sáv és az észter $\text{C}=\text{O}$ rezgés intenzitásának aránya jól leírja fehérje/lipid arányt (Annak nem abszolút értékét, mert ahhoz tudnunk kellene az egyes rezgések extinkciós koefficiensét, de azokat változatlanul tételezve fel, pontosan megadja a fehérje-lipid arány megváltozását.)

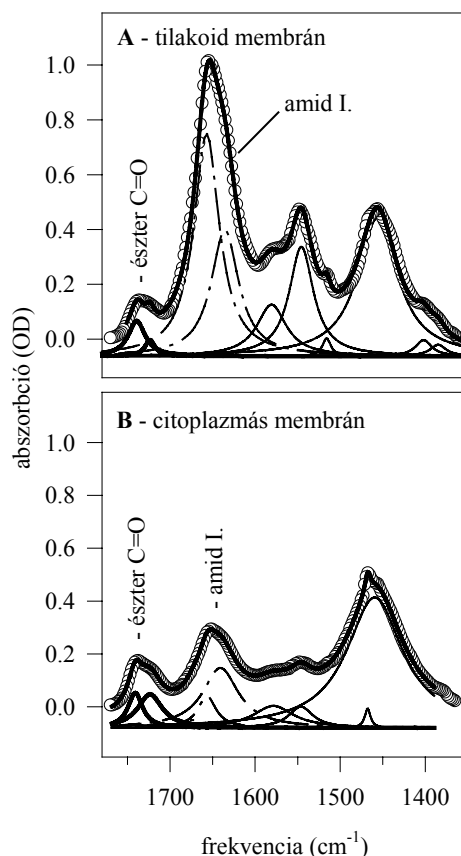
Ha ezek után megnézzük, hogy milyen a tilakoid, illetve a citoplazma membránok amid I és észter $\text{C}=\text{O}$ rezgési tartománya ([13. ábra](#)), akkor azt látjuk, hogy fehérje-lipid arány a tilakoid membránokban kb. ötször akkora, mint a citoplazma membránokban. (A pontos adatok a Szalontai és mtsi. [\[S3\]](#) közleményének [I. táblázatában](#) vannak (52).) A fehérje/lipid arány nagyjából ugyanakkora a vad típusú és a mutáns sejtekben. Ez azt mutatja, hogy a genetikai manipuláció belül maradt az általunk szándékolt kereteken, és valóban csak a lipideket érintette.

Az ESR és a fluoreszcencia anizotrópiai mérések azt mutatták, hogy az ott használt próbák mobilitása nagyobb volt a citoplazma membránban, mint a tilakoidban (78). Ezekből az adatokból arra a következtetésre jutottak, hogy a citoplazma membránnak nagyobb a fluiditása (bármit is jelentsen az), mint a tilakoidénak. Ezzel összhangban, alacsonyabb gél→folyadékkristály fázisátmeneti hőmérsékleteket mutattak ki a citoplazma membránokra (78-80).

Itt emlékeztetni kell azonban arra, hogy az infravörös spektroszkópia egészen más energiatartománnyal operál, mint az ESR vagy a fluoreszcencia spektroszkópia. Az infravörös spektrumban a rendszerben levő valamennyi molekula szegmens elemi

⁴⁰ Ez szigorúan véve csak a klorofillt nem tartalmazó membránokra igaz, mert ugyanilyen észter kötésekkel kapcsolódnak a fitoll láncok a klorofilokban. Klorofill tartalmú membránokban fel kell tételeznünk a klorofill szint változatlanságát. A klorofilok azonban egyáltalán nem befolyásolják a tilakoid és a plazma membrán fehérje-lipid arányáról mondottakat, mert csak a tilakoidokban vannak, és hozzájárulásuk ellene dolgozik tilakoidokról állított nagyobb fehérje-lipid aránynak.

mozgása jelen van, ezzel szemben egy egész (megjelölt) molekula mozgását nézzük a másik két technika esetében. Így aztán, a sokkal nagyobb fehérje-lipid arány



13. ábra: Vad típusú *Synechocystis* PCC 6803 sejtekből (növekedési hőmérséklet 35 C°) származó tilakoid (A) és citoplazma (B) membránok amid I és észter C=O rezgési tartománya. Vegyük észre a sokkal nagyobb amid I/észter C=O arányt a tilakoid membrán esetében. A körök jelentik a mért spektrum pontokat (a jobb láthatóság érdekében csak minden másodikat ábrázoltam.) A folyamatos görbe a körök belsejében annak az illesztésnek az eredménye, amit a spektrum alatt felrajzolt komponensekkel kaptunk. A vastagabb vonallal kihúzott komponensek felelnek meg a C=O rezgéseknek, a szaggatott komponensek az amid I rezgéseknek. (Mivel itt nem lehetett cél egy fehérje másodlagos szerkezetének részletes vizsgálata, tekintettel a nagyon sok különböző fehérjére, ami egy membránban van, az illesztés csak a minimális számú komponenssel történt, amikkel jól „ki lehetett tölteni” az amid I sávot.

következtében, előfordulhat, hogy a „lipid-szerű” jelölt molekula mozgása korlátozottabb a tilakoid membránban, még akkor is, ha ott a lipid molekulák láncai rendezetlenebbek (töredezetlenebbek) a nagyobb arányú fehérje-lipid kölcsönhatás következtében, mint a kisebb fehérje tartalmú, és ezért nagyobb összefüggő lipid mátrix-szal (még ha esetleg rendezettebbel is) rendelkező citoplazma membránban.

Ezek alapján nem érzem úgy, hogy továbbra is fennállna az ellentmondás a mi konklúzióink és a korábbi eredmények között. (Csoportunkban végeztünk is egy szisztematikus vizsgálatot azzal kapcsolatban, hogy hogyan viszonyulnak egymáshoz az infravörös, illetve ESR spektroszkópiával a biológiai membránokban levő lipidek állapotáról kapott adatok (81), de ennek tárgyalása kívül esik jelen témánkon.) Eredményeink mindenesetre felhívják a figyelmet arra, hogy az aktuális fehérje/lipid arányokra mindig tekintettel kell lenni, bármilyen membránszerkezet vizsgáló módszert használjunk is.

Ezek után megvizsgálhatjuk, hogyan hatnak a fehérjék a membránok lipidjeinek szerkezetére. Itt érdemes felidézni, egészen korai, modellrendszeren végzett vizsgálatokat is. Glikoporin fokozatos beépítése dimirisztoil foszfatidil-kolin (DMPC) multirétegekbe eltüntette a gél→folyadékkristályos fázisátmenet előtti pre-tranzíciót (amit jól mutat a [2. ábra](#)), kiszélesítette az átmenetet, és megnövelte az infravörös spektrum $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ sávjának szélességét (82). Hasonló eredményeket kaptak Ca^{2+} -ATPázon és bakteriorodopszinon is, dipalmitoil foszfatidil-kolin (DPPC) vezikulákban ezek a fehérjék a fázisátalakulási hőmérséklet alatt megemelték a *gauche* izomerek mennyiségét a lipidben (83).

A tilakoid membránokban sokkal nagyobb fehérje/lipid aránynak a mi esetünkben az a következménye, hogy a lipidek sokkal nagyobb hányada lesz fehérje-lipid határfelületen, ezeknek nagyobb arányban lesznek „tört” láncok, nem termikusan indukált, hanem szerkezeti okokból. Ezek a tört láncok megmaradnak akkor is, ha alacsony hőmérsékletre helyezzük a membránokat, nem csökken le a mennyiségük, mint a termikusan gerjesztett rendezetlenségé. Ezért arra számítottunk, hogy alacsony hőmérsékleten a magasabb fehérje/lipid arányú tilakoid membránokban magasabb marad a tört (rendezetlen) szegmensek relatív mennyisége, és ennek megfelelően magasabb lesz az ilyen membránokban mért $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ frekvencia, mint az alacsony fehérje/lipid arányú citoplazma membránokban. Ha a növekedési hőmérséklet alatti tartományban összehasonlítjuk a $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ frekvenciákat akár a vad típusú sejtek ([12. ábra](#)), akár a mutáns sejtek ([11. ábra](#)) tilakoid és citoplazma membránjaiban, láthatjuk, hogy valóban ez a helyzet.

Összefoglalva a hőmérséklet, a lipidek telítetlensége, és az időközben felmerült fehérje/lipid arány hatását a membrándinamikára, megállapíthatjuk, hogy az a lipid rendezetlenség, amit a hőmérséklet növekedésével felfele tolódó $v_{\text{sym}}\text{CH}_2$ frekvencia jelez, az összeadódó „szerkezeti” és „dinamikus” lipid rendezetlenség következménye. A szerkezeti lipid rendezetlenség függ az adott membrán fehérje tartalmától. A vad típusú sejtekben a $v_{\text{sym}}\text{CH}_2$ frekvencia, tekintet nélkül az adott membrán fehérje/lipid arányára, a sejtek nevelési hőmérséklete táján nagyon hasonló volt a tilakoid és a citoplazma membránokban. Ez arra utal, hogy egy meghatározott mértékű membrándinamikára van szükség a membránok működéséhez. Amikor, lipid deszaturáz hiányos mutánsok révén, minden többszörösen telítetlen zsírsavat eltávolítottunk a membránokból, akkor nyilvánvalóvá vált, hogy a membrándinamikának a lipidek telítetlenségével való szabályozása sokkal fontosabb alacsony hőmérsékleteken, mint magasakon. Ezen kívül, az is kiderült, hogy az aktuális fehérje/lipid arányt mindig figyelembe kell venni, ha biológiai membránok szerkezetéről, dinamikájáról akarunk mondani valamit.

Lipidek a stressz hőmérsékletek érzékelésében? [S4]

Az egy kiterjedt, és ebben a pillanatban még nyugvópontra egyáltalán nem jutott kutatási terület, hogy a sejtek hogyan szereznek tudomást arról, akár a magas, akár az alacsony hőmérsékletek irányában, hogy bajban vannak, vagy nemsokára lesznek, ha a hőmérséklet tovább emelkedik/csökken.

A sok lehetőség között, hogy a sejt honnan tudja meg, extrém, beavatkozást igénylő hőmérsékletek közé került, felmerült az is, hogy a sejtmembránok, illetve azok szerkezete lenne valahogyan a hőmérsékleti szenzor, aminek a jele eljut valamilyen módon a sejt megfelelő részeihez, amik aztán válaszolnak a stresszre.

Mint láttuk, a biológiai membránokban elsősorban a lipidekhez köthető $v_{\text{sym}}\text{CH}_2$ rezgések frekvenciájának hőmérsékletfüggése jól leírja a membrán elválasztó szerepéért felelős zsírsavláncok dinamikáját. Ez a dinamika azonban csak alacsony hőmérsékleten változik meredeken a hőmérséklet függvényében, magas hőmérsékleteken egy egyenletesen és csak kismértékben emelkedő görbét ad. Ezért,

ha bármiféle jelző funkcióra gondolhatunk a lipidekkel kapcsolatban, akkor én azt inkább az alacsony hőmérsékleti stressz esetén képzelem el.

Valóban, fentebbi eredményeink is azt mutatják, hogy a lipideknek, pontosabban telítetlenségük mértékének, inkább az alacsony hőmérsékletekhez való adaptációban van jelentősége. Ráadásul, hogy ez az adaptáció megvalósulhasson, ahhoz specifikus fehérjékre, a desaturáz enzimekre van szükség. Arra, hogy a megfelelő membrándinamika alacsony hőmérsékleten való fenntartásához szükséges desaturáz enzimek génjei aktiválódnak, ha csökkentjük a *Synechocystis* sejtkultúra hőmérsékletét, már voltak kísérleti bizonyítékok (84), arra azonban nem, hogy a desaturáz gének indukciója összefüggne a sejtek membránjainak dinamikájával⁴¹. Ha találnánk valamilyen egyezést a hidegben aktiválódó gének aktivációjában, és a membrán lipidek dinamikájában, az kiinduló pont lehetne a szabályzó mechanizmus felderítéséhez.

Ebben az irányban tett eddigi lépésünk [S4] a következő volt (86): Megnéztük, hogy vad típusú, illetve *desA⁻/desD⁻* *Synechocystis* sejtek hőmérsékletét csökkentve, mikor kezdődik el a hidegben aktív gének indukciója az egyikben, illetve a másikban. A hőmérsékleti kezelés azt jelentette, hogy 34 C°-on nevelt sejtek hőmérsékletét fokozatosan 22 C°-ra csökkentettük. Ezen az alsó hőmérsékleten a vad típusú sejtek citoplazma membrán lipidjei még majdnem folyadékkristályos, a *desA⁻/desD⁻* sejtek citoplazma membránjának lipidjei pedig már majdnem teljesen gél állapotban vannak (Hasonlóan, mint az a WC35 és MC35 citoplazma membránok esetében látszik a [10.B.](#) és a [11.B. ábrán](#)). A gének indukcióját a 36-22 C° tartományban, DNS csipen követtük nyomon. Ennek alapján a hideg-indukált gének három csoportra voltak oszthatóak a membránlipidek merevsége szempontjából: (i) Az első csoportba olyan gének tartoztak, amik a hideg kezelés hatására nem indukálódtak a normál sejtekben, de erősen indukálódtak a merevebb membránú mutáns sejtekben. Ebben a csoportban hősokk gének, a szulfát-transzport rendszer egyes alegységeinek génjei, és a hik34 hisztidin-kináz gén volt (a hik34 génről gondolják, hogy többek között első lépését jelenti a desaturáz gének

⁴¹ Kivéve, amikor külső behatással, vízóldékony katalizátor alkalmazásával telítették a plazma membránok többszörösem telítetlen zsírsavainak egy részét (85).

aktivációjának). (ii) A második csoport olyan génekből állt, amelyeknek hideg-indukálhatósága nem nagyon függött a sejtek membránjainak állapotától. A legtöbb ilyen gén egyelőre ismeretlen funkciójú fehérjét kódol. (iii) A harmadik csoportba olyan gének tartoztak, amiknek indukálhatósága egyáltalán nem függött a membrán milyenségétől. Ide tartozott pl. egy RNS-helikáz és egy RNS-kötő fehérje génje. Ha ellenkező irányba indultunk el a hőmérséklettel, akkor azt találtuk, hogy a membránok lipid összetételének nem volt hatása a gének hő-indukciójára.

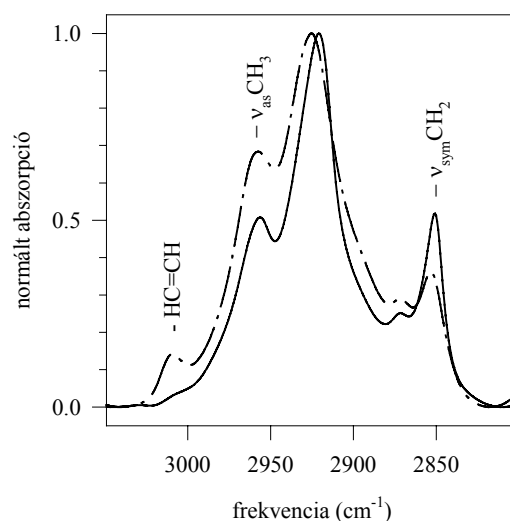
Ami a gének kifejeződését illeti, azok a gének, amiknek hideg-indukciója sokkal erősebb volt a *desA⁻/desD⁻* sejtekben, a hőmérséklet csökkentésével 4-6 C°-kal előbb kezdtek el megjelenni a *desA⁻/desD⁻* sejtekben, mint a vad típusúakban ([S4], 3. ábra). Ez azt jelenti, hogy 36 C°-ról elindulva a gének kb. 30 C°-on kezdtek el hideg-indukálódni a *desA⁻/desD⁻* sejtekben, és kb. 26 C°-on a vad típusúakban. Eközben a *desA⁻/desD⁻* sejtben a citoplazma dinamikáját mérő v_{symCH_2} frekvencia kb. 0.8 cm⁻¹-nyit csökkent (kb. 2853.3 cm⁻¹-ről 2852.5 cm⁻¹-re). A vad típusú sejtben a csökkenés kb. 1.5 cm⁻¹ volt (kb. 2852.5 cm⁻¹-ről 2851 cm⁻¹-re) ([S4], 1. ábra). Az egyelőre nem világos, hogy a változás nagysága, vagy egy abszolút érték számít a membrán dinamikára alapozott esetleges jeladásban. Én arra hajlanék, hogy talán inkább a változás nagysága, de ennek eldöntése még további vizsgálatokat igényel.

Mindenesetre a fentebb kitűzött, első lépést úgy érzem megtettük annak felderítése érdekében, hogy hogyan függhetnek össze a sejt membrándinamikai tulajdonságai a hideg stresszre adott sejtválasszal.

A foszfatidil-glicerol membránszerkezeti szerepe a magasabb rendű növények hidegtűrésében [S5]

Előzmények

Az régen megállapított alaptétel, hogy a növényi membrán lipidjeinek fázisátalakulási hőmérséklete és a növény fagyérzékenysége között szoros összefüggés van (87;88). Úgy gondolták, hogy a fagyérzékeny növények lipidjei gél



14. ábra: *Synechococcus* PCC7942 (korábban: *Anacystis nidulans* R2) (—), és dohány (— • —) tilakoid membránok infravörös spektrumának C-H rezgési tartománya. Figyeljük meg, hogy a dohány spektrumában milyen erős a HC=CH csoportok rezgéséből származó sáv 3010 cm^{-1} -nél, illetve a dohány tilakoidban sokkal magasabb fehérje/lipid arány miatt, milyen intenzív a 2958 cm^{-1} táján levő $\nu_{\text{as}}\text{CH}_3$ sáv⁴², illetve mennyivel gyengébb, és magasabb frekvenciánál van a $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ sáv, mint a cianobakteriális tilakoid membránban.

fázisba mennek át alacsony hőmérsékleteken, a fagyűrő növények lipidjei viszont folyadékkristályos állapotban maradnak. A fázisátmeneti hőmérsékletnek a nevelési hőmérséklet függvényében való eltolódását cianobaktérium tilakoid membránokon fentebb bemutattuk ([10. ábra](#)). Magasabb rendű növényekben azonban tilakoid membrán szinten nem tudtak kimutatni a cianobaktériuméhoz hasonló fázisátmenetet. Ennek legvalószínűbb oka az, hogy a magasabb rendű növények lipidjei sokkal telítetlenebbek, mint a cianobaktériumokéi, ezért $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ fölött mindenhol folyadékkristályos állapotban vannak. Például, borsó tilakoidban a $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ frekvenciája $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ -nál kb. 2853.3 cm^{-1} . A cianobaktériumban pedig ugyanez a frekvencia kb. 2851 cm^{-1} -nél van ugyanezen a hőmérsékleten. A cianobakteriális és a magasabb rendű növény tilakoid membránja közti különbségeket illusztrálандó, a [14. ábrán](#) bemutatom infravörös spektrumaik C-H rezgési tartományát.

⁴² Nemcsak a fehérje amid I sáv és a lipid észter C=O sáv intenzitásának aránya tükrözi a fehérje lipid arányt a membránban. Az aminosav oldalláncokban kb. 2:1 a $\text{CH}_3:\text{CH}_2$ csoportok aránya, a lipidek 16,18:1 arányához képest, így a több fehérje jelenléte a membránban a CH_3 rezgések relatív növekedéséből is látszik.

Magasabb rendű növényekben csak akkor sikerült összefüggést kimutatni a növény fagyérzékenysége és a zsírsavláncok telítetlensége között, ha az egyes lipid osztályokat vizsgálták. A fűfélék kloroplasztisz membránjaiban együtt változott a fagyérzékenység és a foszfatidil-glicerol (PG) telített és transz-mono-telítetlen zsírsavtartalma (magas olvadáspontú molekulafajták, „high-melting point” molecular species) (89;90). Több másféle növény esetében is hasonló megfigyelést tettek. Ezeknek a PG molekuláknak, *in vitro* mérések szerint, a szobahőmérséklet táján van a gél→folyadékkristályos fázisátmenete (91). *In situ* azonban nem sikerült kimutatni a PG fázisátmenetét. Ennek egyrészt oka lehetett az, hogy a magas olvadáspontú PG mennyisége kicsi (5-10%) a tilakoid membránokban, másrészt az, hogy a használt módszerek nem voltak eléggé specifikusak és érzékenyek.

A mi megközelítésünk két fontos elemben tért el a korábbiaktól: (i) Genetikai manipulációval megváltoztattuk a dohány PG molekuláinak (de csak azoknak) a zsírsavösszetételét, így összehasonlíthattuk a vad típusú és a mutáns dohányokat. Egy bármilyen kicsi, de ismert eredetű különbséget egy fajta mutánsai között keresni ígéretesebbnek tűnt, mint különböző növények sok, általában ismeretlen eredetű különbsége közül kihalászni egyet. (ii) Fourier transzformációs infravörös spektroszkópiát használtunk, és igazi kihívást jelentett, vajon ilyen kis különbségeket is ki tudunk-e mutatni vele.

A transzgenikus növények lipid és zsírsavösszetétele

Korábban rendelkezésünkre álltak olyan dohány transzformánsok, amiket egy *pSQ* kettős plazmiddal transzformáltak. A plazmid úgy készült, hogy összetették a tök glicerol-foszfát acil transzferáz (GPAT) enzimjét kódoló cDNS-t egy olyan fehérjét kódoló DNS-sel, ami biztosítja, hogy a keletkezett GPAT bekerüljön majd a kloroplasztiszba. Az egész plazmidot a karfiol 35S mozaik vírus szabályozó régiójának szabályzása alá rendelték, ennek következtében ez a plazmid folyamatosan működött, a dohányba való transzformálása után sem állt a dohány rendszerének kontrollja alatt. Ez a megoldás lehetővé tette a tök GPAT enzimének túltermeltetését a transzgenikus dohány kloroplasztiszában. Az ilyen

transzformánsokat TOSQ-val fogom jelölni. Készítettek ugyanilyen módon egy másik transzformánst is, amibe az *Arabidopsis thaliana* GPAT enzimének génjét építették be. Ezt a transzformánst TOAR-ral fogom jelölni. Az *Arabidopsis* egy, a dohánynál hidegtűrőbb növény, és ennek megfelelően telítetlenebbek is PG molekuláinak zsírsavláncai, így GPAT enzime a tökével ellentétes irányba kellene, hogy változtassa a dohányt a transzformáció után.

A transzgenikus dohányokban valóban jelentősen megváltozott a PG molekulák zsírsavösszetétele, mégpedig a várt irányokban. A dohányra jellemző 32 mol%-os cisz-telítetlen zsírsavtartalom a TOSQ transzformánsokban 12 mol%-ra csökkent, a TOAR transzformánsokban enyhén nőtt, 36 mol%-ra (92).

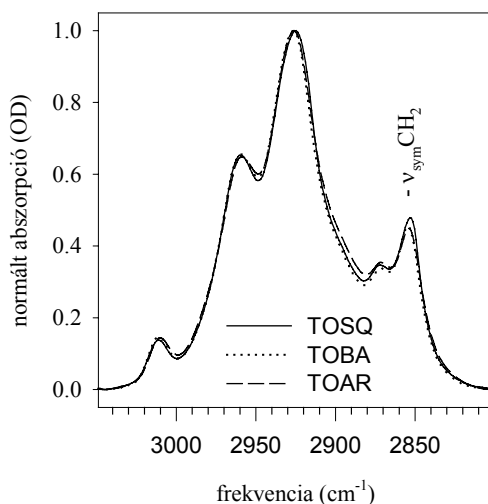
Ezzel a rendszerrel, tulajdonképpen minden tekintetben, kivéve a PG zsírsavösszetétel megváltoztatását, egy növénygel, a dohánnyal dolgoztunk. Így remélhettük, hogy a köztük leendő különbségek a PG molekulák zsírsavösszetételének megváltoztatásával lesznek kapcsolatosak.

A C-H rezgési tartomány analízise

Három növény tilakoid membránjait vizsgáltuk, a dohányét (TOBA), a tök GPAT-tartalmazó transzformáns dohányét (TOSQ), és az *Arabidopsis* GPAT-t tartalmazó transformáns dohányét (TOAR). A három növény infravörös spektrumának C-H rezgési tartománya nagyon hasonló volt ([15. ábra](#)). A $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ -sávban talált ilyen kis különbségek kiértékeléséhez egyrészt segítségül kell hívni a hőmérsékletfüggés vizsgálatát, másrészt nem elegendő a $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ sáv egy komponenssel való illesztése, hiszen, mint azt a [5.A. ábra](#) mutatja, az egykomponenses illesztés hibája abban a tartományban van, mint a [15. ábrán](#) az analizálni kívánt különbségek. Két-komponenses illesztés esetén ([5.B. ábra](#)) csökken le a hiba annyira, hogy remény van ilyen kis különbségek értelmezésére.

Ezeket az illesztéseket 5 C°-on felvett spektrumokra elvégezve, ha összehasonlítjuk a dohányt (TOBA), a tök GPAT-t tartalmazó transzformánst (TOSQ) és a tököt magát (SQUA), akkor a várakozásunknak megfelelő különbségeket találjuk ([16. ábra](#)).

A hőmérséklet függvényében 5 és 65 C° között felvett spektrumok kiértékelésénél a következő stratégiát követtük: Mivel a rendezett szegmenseket reprezentáló **O** komponensről azt tételezzük fel, hogy a hőmérséklet emelésével

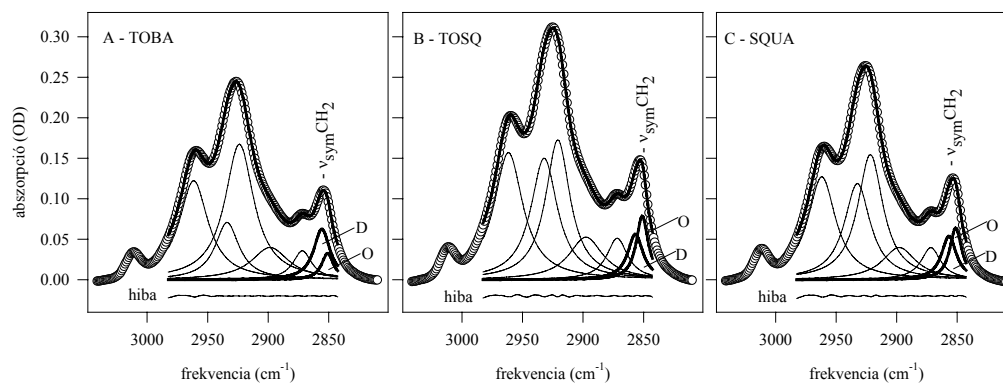


15. ábra: Vad típusú dohány (TOBA), tök GPAT génnel transzformált dohány (TOSQ) és *Arabidopsis* GPAT-zal transzformált dohány (TOAR) tilakoid membránok C-H rezgési tartománya.

„elolvad”, annak frekvenciáját és sávszélességét fixen tartottuk az 5 C°-on felvett spektrumban kapott értéken. (Az **O** komponens ezen a hőmérsékleten volt a legintenzívebb, tehát itt lehetett a legpontosabban meghatározni paramétereit.) Ezzel ellentétben, a **D** komponens minden paraméterét (intenzitás, frekvencia, sávszélesség) mindig illesztettük, hiszen a hőmérséklet növekedésével egyre növekvő mennyiségű rendezetlen zsírsavlánc szegmenseknek szükségképpen lesz eloszlása. Hogy a különböző kísérleteket összehasonlíthassuk, az alapvonal levonása után, valamennyi spektrumot normáltuk az illesztett tartomány (3050-2820 cm⁻¹) integráljával.

Az így kapott eredményeket mutatja a [17. ábra](#), azzal a további módosítással, hogy a különböző membránokon kapott eredmények összehasonlíthatósága érdekében nem az **O** és a **D** komponenseket, hanem az **O/D** intenzitásának arányát

ábrázoltuk a hőmérséklet függvényében.⁴³ Mint az a [17. ábrán](#) látszik, a TOBA igen enyhe *O/D* csökkenést mutat 5 és 25-30 C° között, azután az arány gyakorlatilag nem



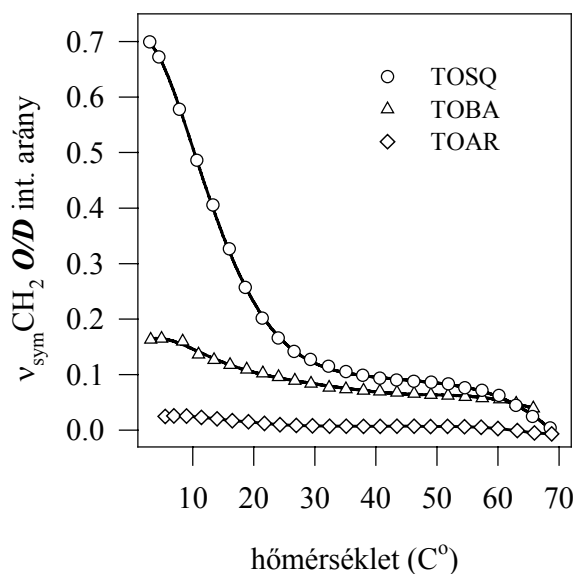
16. ábra: Dohány (TOBA), dohány tök GPAT transzformáns (TOSQ) és tök (SQUA) 5 C°-on felvett tilakoid membrán infravörös spektrumának C-H rezgési tartománya. *D* – a rendezetlen (disordered) szegmensek hozzájárulása, *O* – az rendezett (ordered) szegmensek hozzájárulása a $v_{\text{sym}}\text{CH}_2$ sáv intenzitásához. Figyeljük meg, hogy a *D* intenzitása a hidegtűrőbb (több telítetlen zsírsavat tartalmazó) dohányban nagyobb, mint a melegkedvelő (kevesebb telített zsírsavat tartalmazó) tökben. A TOSQ láthatóan a tökhöz áll közelebb.

változik. A TOAR esetében egyáltalán nincs töréspont, és az *O/D* arány végig alacsonyabb, mint a TOBA esetében. Alacsony hőmérsékleteken az *O* relatív mennyisége a TOSQ-ban a legnagyobb. Erre számítani is lehetett, hiszen a TOSQ PG molekuláiban, mint azt fentebb megtárgyaltuk, a telített zsírsavláncok aránya sokkal magasabb, mint a TOBA-ban (76% TOSQ-ban, szemben a TOBA 36%-ával). Úgy néz ki, hogy van egy merev, rendezett lipid készlet a TOSQ-ban, aminek a hőmérséklet növekedésével először el kell olvadnia, azután már nincsenek számottevő különbségek a tilakoid membránok között.

Ami számunkra is meglepő volt, és még mindig további vizsgálatokat igényel, az ennek a merev lipid készletnek a mértéke, illetve talán nem is maguknak a telítettebb PG molekuláknak a mennyisége számít, hanem a szerkezeti hatás, amit el tudnak érni, vagyis ennek a hatásnak a mértéke meglepő. Végül is, a PG molekulák az

⁴³ Az arány abszolút értéke változhat membránról membránra, ha a fehérje/lipid arány változik az összehasonlítandó membránokban. Ennek az az oka, hogy a fehérjék CH_3 és CH_2 csoportjai egy, a lipid fázisállapotra ugyan érzéketlen, de jelentős háttérrel adhatnak a C-H rezgési tartományban, ami befolyásolja az *O/D* arányt. Esetünkben azonban a fehérje/lipid arány csaknem tökéletesen megegyezett a három tilakoidban mint azt az amid I/észter $\text{C}=\text{O}$ sávok aránya mutatja ([55], 3. ábra).

összes lipid kb. 10 %-át teszik ki, és ezeknek kb. 2/3-át változtattuk telítettre. Fel lehet azonban tételezni, hogy a telítetlen PG-k kicserélésével telítettek a szerkezeti következmények nem csak a sztöchiometria szerint jelennek meg, hanem valamilyen szinergikus hatás is van. Ez egyáltalán nem kizárt, ha a kiinduló megfigyelésre gondolunk, hogy hogyan határozhatja meg a membránok lipid tartalmának



17. ábra: A $v_{\text{sym}}\text{CH}_2$ sáv két komponensre való felbontásakor kapott rendezett (*trans*) (*O*) és a rendezetlen (*gauche*) (*D*) komponensek intenzitás arányának hőmérsékletfüggése vad típusú dohányban (TOBA), a dohányénál telítetlenebb PG-t tartalmazó TOAR, és a dohányénál telítettebb PG-tartalmazó TOSQ transzformánsokban.

mindössze 10 %-át kitevő PG a növények hidegtűrését.

Ha tehát most feltesszük magunknak a kérdést, milyen különbségre számítunk a vad típusú dohány (TOBA) és a tök GPAT-t tartalmazó transzformáns között, akkor azt mondhatjuk, hogy a két növény tilakoid lipidjeinek konformáció eloszlása 20-25 C° alatt nagyon eltérő, a TOSQ tilakoid lényesen rendezettebb, mint a TOBA tilakoid. Azaz, olyan fiziológiai folyamatok között számíthatunk különbségekre, amikben az ennél alacsonyabb hőmérsékleteknek van szerepe.

Nos, alapos fiziológiai vizsgálatok TOBA-n és TOSQ-n csak egy lényeges különbséget tudtak kimutatni, mégpedig az alacsony hőmérsékletű fotoinhibíció tekintetében (93). A különbség a fotoinhibícióra való érzékenységben, és az utána következő felépülés sebességében volt. A fotoinhibíciós kísérletek során a

növényeket meghatározott időre 1 C°-ra helyezték, ennek következtében a fotoszintetikus aktivitásuk lecsökkent (a TOSQ-ban sokkal erősebben, mint a TOBA-ban), azután a növényeket ismét normál hőmérsékletre helyezték. A fotoinhibícióból való felépülés sokkal lassabb volt a TOSQ esetében, mint a TOBA-éban. Azt gondoljuk, hogy a desA⁻/desD⁻ cianobaktériumok esetéhez hasonlóan, itt is arról van szó, hogy a merevebb tilakoid membránnal rendelkező TOSQ-ban korlátozottabb a membrándinamika, ezért az új D1 fehérjék beépítése, amit a regenerációs folyamat döntő lépésének tartanak, nem megy olyan könnyen végbe, mint a vad típusú dohányban.

Összefoglalva, a tök típusú PG molekulák bevitele a dohányba mérhető változásokat okozott a membrán dinamikájában, de csak az 5-25 C°-os tartományban, és a fehérje molekulák nem voltak érintettek ezekben a változásokban⁴⁴. A transzgenikus eredetű PG molekulák a transzformált növényekben valószínűleg a fehérje-lipid határfelületen halmozódnak fel. Ezért aztán a tök GPAT dohánybeli kifejeződésének csak olyan fiziológiai folyamatokra van hatása, amelyek a lipidek alacsony hőmérsékleti dinamikájától függenek. Az eredmények rámutatnak a PG kitüntetett szerepére is a membránok hőmérséklet adaptációjában.

A fény szerepe a hőmérséklet adaptációban [S6]

A fény és a hőmérséklet együttes hatását intenzíven kutatják. Mint fentebb én is érintettem a membrándinamikai eredményeknek a fotoinhibícióval való kapcsolatánál, az világosan látszik, hogy mind a cianobaktériumok, mind a magasabb rendű növények érzékenyebbek a fényre alacsony hőmérsékleten (94-97). Egy korábbi vizsgálatban Kis és mtsi. (98) kimutatták, hogy a fény szabályozza a hőmérséklet adaptációhoz elengedhetetlenül szükséges desaturáz enzimek génjeinek kifejeződését.

⁴⁴ A fehérjékről még nem esett szó, róluk majd a membránfizikai vizsgálatoknál beszélünk, de itt azért össze akartam foglalni az egész rendszer helyzetét a genetikai manipuláció után.

Az azonban egyáltalán nem világos, hogy a fény-szabályozott folyamatok eredményei, a gének átíródása, a fehérje és a lipid szintézis, a lipid deszaturáció hogyan jelennek meg az élő sejt szerkezetében, és dinamikájában. Ezért határoztuk el, hogy megvizsgáljuk a fény és a fény által hajtott fotoszintetikus folyamatok hatását a membránok kialakulására és szerkezetére cianobaktériumokban.

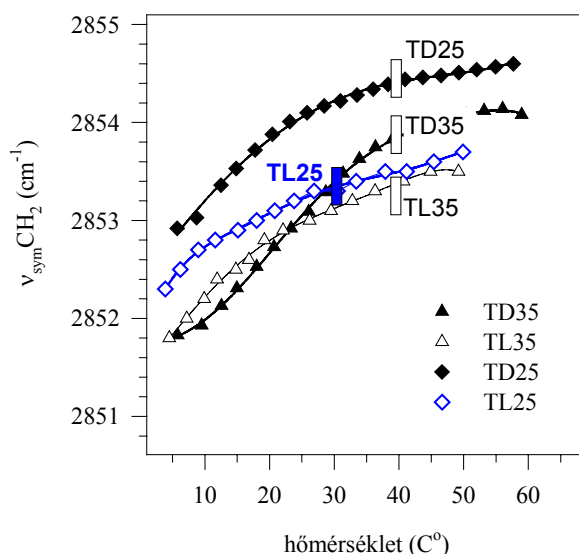
A fény hatásának tanulmányozásához a sejteket fotoautotróf módon (fény-adaptált sejtek) és fény-aktivált heterotróf módon (sötét-adaptált sejtek) neveltük. A fény-aktivált heterotróf nevelés azt jelenti, hogy a sejtek egész nap, egy 10 perces fénykezelés kivételével, sötétben voltak. Hogy a sejtek a sötétben is energiához juthassanak, a standard BG-11 tápoldathoz 5 mmol.L⁻¹ glukózt adtunk (99). A sejtek sötétben való ilyen nevelésük révén megőrizték fotoszintetikus apparátusukat, bár morfológiájuk erősen megváltozott ([S6], [1. ábra](#)) (100). Normál fényviszonyok közé helyezve a sejteket, azok azonban 36 órán belül tökéletesen regenerálódtak. Mindkét fajta sejtet 25 és 35 C°-on is felneveltük.

Először azt néztük meg, hogyan adaptálódik a fotoszintetikus aktivitás a nevelési hőmérséklethez, illetve, hogy van-e erre az adaptációra befolyása a fénynek. Az derült ki, hogy a fény-adaptált sejtekben a fotoszintetikus aktivitás (amit az O₂ fejlesztéssel jellemeztünk) maximuma adaptálódik a nevelési hőmérséklethez, hiszen az 31 C° volt a 25 C°-on nevelt sejtekben, és 40 C° a 35 C°-on neveltékben. A sötét-adaptált sejtekben nem volt hőmérséklet adaptáció, a 25, illetve 35 C°-on nevelt sejtek fotoszintetikus aktivitásának maximuma 39 illetve 40 C°-on volt ([S6], [2. ábra](#)).

Ezzel szemben, a sejtek membránjainak dinamikája igencsak megváltozott, mind a hőmérséklet, mind a fény hatására. A fényben nőtt, „normális sejtek” a korábban bemutatott homeodinamikus ([10. ábra](#)) adaptációra jellemző dinamikai görbéket adták a v_{symCH_2} sáv egy-komponensű analízise során. A sötétben nevelt sejtek tilakoidjainak rendezetlensége a növekedési hőmérsékleten mindig meghaladta a megfelelő fény-adaptált sejtekét, de mutatta a „magasabb növekedési hőmérséklet –

magasabb fázisátmeneti hőmérséklet” szabályt is: A 25 C°-on nőtt sejtekre 25 C°, a 35 C°-on nőttekre 34 C° volt a fázisátmeneti hőmérséklet⁴⁵.

A fotoszintetikus aktivitás és a membránok adatait összevetve nagyon érdekes eredményre jutunk ([18. ábra](#)). Az látszik az ábrán, hogy a membránok rendezetlenebbek, ha sötétben nőnek a sejtek. A membránok rendezetlensége (mind a fény-adaptáltaké, mind a sötét-adaptáltaké, páronként) a várt módon függ a nevelési



18. ábra: *Synechocystis* PCC6803 sejtek tilakoid membrán dinamikájának összehasonlítása maximális fotoszintetikus aktivitásuk hőmérsékletével 35 C°-on sötétben (TD35), illetve fényen (TL35); 25 C°-on sötétben (TD25), illetve fényen (TL25) nőtt sejtek esetében. A görbéken levő üres téglalapok az adott sejt maximális fotoszintetikus aktivitásának hőmérsékletét mutatják. Vegyük észre, hogy csak a 25 C°-on fényben nőtt mintánál (TL25) van hőmérséklet adaptáció a fotoszintetikus aktivitás optimális hőmérséklete tekintetében.

hőmérséklettől. A membránok rendezetlenségével szemben, a fotoszintetikus aktivitás nem adaptálódik sem a növekedési hőmérsékletéhez, sem a membrándinamika szintjéhez, kivéve a 25 C°-on nevelt fény-adaptált sejteket.

Ha megnézzük ezek után a különböző sejtek membránjainak lipid összetételét, ([\[S6\]](#), [II.](#) és [III.](#) táblázat), akkor azt látjuk, hogy a fényen nevelt sejtekben a lipidek telítetlenebbek, mint a sötétben nevelt sejtekben. A különbség nem pusztán a kettős

⁴⁵ Pontosabban a fázisátmenet végének hőmérséklete, ezt lehetett pontosabban meghatározni a kísérletekből.

kötések számának nagyobb voltát jelenti a fény-adaptált növényekben, hanem azt, hogy ezek a plusz kettőskötések olyan többszörösen telítetlen (α -18:3, 18:4) zsírsavakat jelentenek, amik egyáltalán nincsenek meg a sötétben nevelt sejtekben.

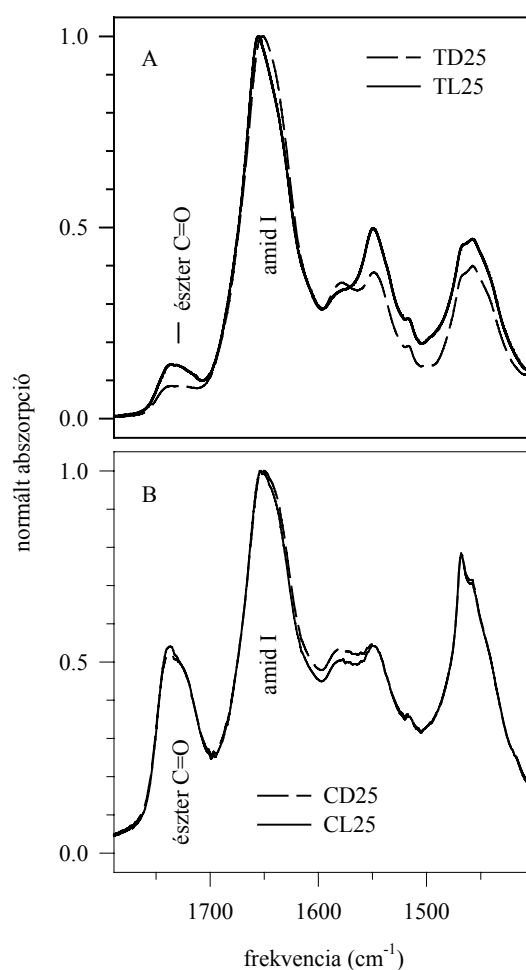
Ez a megállapítás egyezik a különböző deszaturáz gének fény-szabályozott kifejeződéséből levonható következtetéssel (98). A Δ^9 -deszaturázt kódoló *desC* átíródását sem a hőmérséklet, sem a fény jelenléte, vagy hiánya nem befolyásolta, az konstitutíven kifejeződött fényben is és sötétben is. Az ω^3 -deszaturázt kódoló *desB* átíródása elhanyagolható volt a sötét-adaptált sejtekben, és felerősödött a fény-adaptáltakban. A Δ^{12} és Δ^6 deszaturázokat kódoló *desA* és *desD* gének átíródása a sötét-adaptált sejtekben ugyan magasabb volt, mint a *desB*-é, de ezeknek a géneknek az átíródása fény hatására számottevően megnőtt.

Azaz, úgy látszik, ha nincs fény, a sejtek nem vesztegetnek energiát a deszaturáz enzimek elkészítésére. Ha nincs fény, nincs fotoszintézis, nem kell a fotoszintetikus apparátus igényeinek megfelelően optimalizálni a tilakoid membrán szerkezetét. Márpedig a deszaturázok által előállított telítetlen zsírsavakra láthatóan csak az optimalizációhoz van szükség.

Ezt mutatja, hogy bár a TL25 membrán általános dinamikája a $v_{\text{sym}}\text{CH}_2$ frekvencia tanúsága szerint 25 és 35 °C-között gyakorlatilag nem változik, a fotoszintetikus aktivitás optima mégis eltolódik a növekedési hőmérséklet közelébe (ami nyilván a legjobb a sejteknek), és ezt a TL25-ben levő többszörösen telítetlen zsírsavak teszik lehetővé (18. ábra). Valószínűleg ezek biztosítják az optimális környezetet a tilakoid membránban a fotoszintetikus reakciócentrum működéséhez. Azért gondolkodhatunk így, mert a TD25 esetében nem látni ugyanilyen eltolódást, annak ellenére, hogy az általános membrán rendezetlenség mindenütt magasabb, mint a TL25-ben, de a TD25-ben nincsenek többszörösen telítetlen zsírsavak. Azaz, nem csak egy adott dinamika, hanem specifikus lipidek is kellenek az optimális membrán funkciókhoz, a megfelelő lipid-fehérje kölcsönhatásokhoz.

A fehérjék működéséhez szükséges feltételek meglétéről benyomást szerezhetünk, ha megnézzük, milyen a fehérjék szerkezete, pl. a TL25 és TD25 membránokban (19. ábra). Az infravörös spektrumok amid I sávja a fény-adaptált

tilakoid membránban (TL25) főleg α -hélixeket mutat, a sáv keskenyebb, mint a sötét-adaptált tilakoidban (TD25), ahol a fehérje abszorpció nagyobb az 1630 cm^{-1} körüli tartományban, ami azt jelenti, hogy ott több a β -redő. Ez a különbség az amid I sáv szerkezetében jobban rendezett fehérjékre utalhat a fény-adaptált membránokban⁴⁶.



19. ábra: *Synechocystis* PCC6803 sejtek tilakoid (T) és citoplazma (C) membránja infravörös spektrumának amid I tartománya. A sejteket $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on neveltük, fotoautotrof (L), illetve fény-aktivált heterotróf (D) (azaz többnyire sötétben) módon neveltük.

⁴⁶ Azért ezzel a megállapítással óvatosabbnak kell lennünk. A sötétben élő sejtek egész más metabolizist folytatnak, mint a fotoszintetizálók, amihez minden bizonnyal egészen más fehérjék kellenek. Nem tudjuk, hogy a sötét-adaptált membránokban megőrződött fotoszintetikus apparátus mellett még milyen fehérjék kellenek a heterotróf metabolizmushoz a tilakoid membránban. Önmagában is nagyon érdekes kutatás lenne, hogy mennyiben használnak közös, illetve eltérő metabolikus utakat a fény- és sötét-adaptált cianobaktérium sejtek.

Az eltérő membránszerkezetre még egy paraméter utalhat, a korábban már említett amid I és észter C=O sávok intenzitásának aránya. Ha ezt megnézzük a [19. ábrán](#), akkor azt látjuk, hogy a TD25 membránban sokkal magasabb, mint a TL25-ben⁴⁷. A nagyobb fehérje/lipid arány megmagyarázza, hogy miért látjuk a TD25 membrán lipidjeit rendezetlenebbnek ([18. ábra](#)) annak ellenére, hogy valójában telítettebbek, mint a TL25 membrán lipidjei. Figyelem, a $v_{\text{sym}}\text{CH}_2$ görbe töréspontja ([18. ábra](#)) azért alacsonyabb hőmérsékleten van a TL25-ben, a telítetlenebb zsírsavaknak megfelelően! A fotoszintetikus apparátus fény alatti kiépülésére utal az is, hogy ugyanezen sejtek citoplazma membránjai között nincsenek ilyen különbségek⁴⁸.

Összefoglalva, kísérleteink azt mutatják, hogy a heterotróf, sötétben tartott sejtek is képesek olyan fokú általános dinamikát mutató membránokat készíteni, mint a fotoautotróf sejtek, és ezek a membránok is mutatnak hőmérséklet-adaptációt. A baj csak az, hogy a heterotróf sejtek fotoszintetikus apparátusa egyáltalán nem tud alkalmazkodni az alacsony hőmérséklethez. Erre csak a fotoautotróf sejtek képesek, amik tartalmaznak deszaturáz enzimeket, mert ezeknek génjeit a fény aktiválta, és ennek következtében alacsony hőmérsékleten nevelt sejtjeik membránjai tartalmaznak többszörösen telítetlen zsírsavakat is, amik teljesen hiányoznak a heterotróf sejtekből. Azaz, a többszörösen telítetlen zsírsavaknak nem csak az a szerepük, hogy a megfelelő membrándinamikát biztosítsák, hanem, hogy a fotoszintetikus apparátus számára az optimális membránkörnyezetet megteremtsék. Ez általában is felveti a fehérje-lipid kölcsönhatás kérdését a membránokban, amire majd még visszatérek.

⁴⁷ Ezzel a megállapítással is csínján kell bánnunk. Ha nem csak az irodalmi adatokat, hanem magunkat is kritikusán szemléljük, akkor ebben az esetben valószínű, hogy legalábbis olyan hibáról van szó, amit már említettem (35. lábjegyzet). Az észter C=O intenzitás nem ismert része származhat a TL25-ben nyilván magasabb klorofill tartalomtól, ezért ott az észter C=O sáv intenzívebb, ami lefele változtatja a számolt fehérje/lipid arányt.

⁴⁸ Vannak viszont kisebb különbségek a 35 °C-on nevelt sejtek citoplazma membránjai között, szintén nagyobb fehérje/lipid arányt mutatva a sötét-adaptált sejtek membránjára.

A karotinoidok lehetséges szerepe a hőmérséklet adaptációban [S7]

Azt már láttuk, hogy egyes fotoszintetizáló szervezetek glicero-lipidjeik deszaturálásával igen hatásosan tudnak védekezni a hőmérsékleti stressz, különösen az alacsony hőmérsékleti stressz ellen (101). Azt is tudjuk azonban, hogy vannak olyan szervezetek, amiknek nincsen kifinomult deszaturáz rendszere. Ilyen például a cianobaktériumok között a *Synechococcus* PCC7942, ami csak egyszeresen telítetlen olajsavat tartalmaz, mégis képes majdnem ugyanabban a hőmérséklet tartományban élni (20-39 C°), mint az ilyen rendszerrel rendelkező *Synechocystis* PCC6803 (18–36 C°). Tehát a lipid deszaturáció befolyásolásán kívül más szabályozó mechanizmusoknak is kell lenniük a membrándinamika fenntartására.

A csak egyszeresen telítetlen zsírsavakat tartalmazó *desA⁻/desD⁻* *Synechocystis* mutáns tilakoid, de különösen citoplazma membránjának izolálásakor figyeltünk fel arra, hogy ezek a membránok mennyivel sárgásabbak, mint a normál sejtek membránjai. A sárga szín a karotinoidokból származik. Modell rendszerekben megmutatták, hogy a karotinoidok, amik integráns membránalkotók, alternatív lehetőséget kínálhatnak a membránszerkezet és dinamika befolyásolására (102). Ezek az apoláris, konjugált kettőskötéseket tartalmazó, merev láncú pigment molekulák a magas fényintenzitás elleni védekezést szolgálják a fotoszintetikus membránokban (103). A karotinoid molekuláknak pálca-szerű szerkezete van, aminek hossza nagyjából megfelel a lipid kettősréteg középső, hidrofób rétege vastagságának. A karotinoid molekula egyik vagy mindkét végén gyakran egy poláros csoport helyezkedik el. A karotinoidok elhelyezkedése, és a membrán síkjához viszonyított iránya az adott karotin molekula végcsoportjainak természetétől függ. Ha a végcsoportok apolárosak, akkor a karotin molekula szabadon forog a membránban, akár a membrán síkjával párhuzamosan is elhelyezkedhet, ha a végcsoportok polárosak, akkor átköti a membrán két oldalát, úgy, hogy a végcsoportok a membrán-víz határfelületen helyezkednek el (104-107). Liposzómák és karotinoidok keverékén kimutatták, hogy a karotinoidok hidroxi származékai nemcsak a lipid fázis rigiditását növelték, hanem a protonok áthaladását is gátolták a membránon (108). Sőt, számottevően csökkentették az {oxigén diffúzió*koncentráció} szorzat értékét, szintén modell membránban (109).

Az a kérdés azonban, hogy vajon a karotinoidok jelen vannak-e önállóan a fotoszintetikus membránok lipid fázisában, vagy csak a fotoszintetikus apparátus komplexeiben lehetnek, egyáltalán nem tisztázott. Mindenesetre Havaux és Niyogi azt találta, hogy a xantofilok, jól ismert fényvédő hatásuk mellett, képesek megvédeni a telítetlen glicerolipideket is a peroxidáció ellen (110). Azt szintén megmutatták, hogy a megnövekedett xantofill mennyiség megnöveli a tilakoid membrán lipid fázisának termostabilitását, mégpedig a membrán „fluiditásának” megváltoztatásával (111;112). A xantofill molekulák felhasználhatósága a biomembránok fázisviszonyainak monitorozására szintén arra mutat, hogy xantofill molekulák vannak a membránok lipid fázisában (113). E tekintetben megemlítem egy egészen korai eredményünket, amikor azt találtuk, hogy karotinoidok rezonancia Raman spektroszkópiával megmért fényérzékenysége függ a membránlipidek fázisállapotától (114), ami szintén arra mutat, hogy lehetnek karotinoidok a lipid fázisban.

V. táblázat: Lipid zsírsavak súlyszázaléka $100 \mu\text{Em}^2\text{s}^{-1}$ fényintenzitásnál nevelt *Cylindrospermopsis raciborskii* sejtek tilakoid membránjában.

	TL		MGDG		DGDG		SQDG		PG	
Fatty acid	35°C	25°C	35°C	25°C	35°C	25°C	35°C	25°C	35°C	25°C
16:0	44.9	40.8	45.6	38.8	43.3	36.2	49.4	50.5	24.8	39.4
16:1	2.5	5.6	1.7	5.6	2.9	7.0	2.0	3.8	10.8	5.2
18:0	5.3	3.4	2.6	2.2	12.5	4.2	8.2	4.9	7.5	8.0
18:1	8.1	2.2	4.9	1.8	6.0	1.6	8.6	4.3	43.8	4.0
18:2	23.0	1.7	26.6	1.7	17.6	1.3	20.0	1.8	7.5	1.5
γ 18:3	3.3	1.5	4.0	1.5	4.8	2.6	0.8	0.7	0.5	1.6
α 18:3	10.1	24.8	12.0	22.6	9.5	23.6	7.6	32.8	2.5	28.2
18:4	2.9	20.0	2.6	25.9	3.4	23.6	3.5	1.2	2.6	12.1
S/U	1.01	0.79	0.93	0.69	1.26	0.68	1.36	1.24	0.48	0.90
DBI	1.08	1.70	1.18	1.87	1.01	1.82	0.90	1.17	0.89	1.49

S/U: a telített (saturated) és telítetlen (unsaturated) zsírsavak aránya

DBI: kettős kötés index (double bond index) Ezt úgy számoltam ki, hogy minden egyes lipidre az adott telítetlen zsírsavak összeadott százalékait, amit minden zsírsavra kettős kötésének számával való szorzás után kaptam, elosztottam 100-zal.

A karotinoidok esetleges hő- és fény-stressz elleni védő szerepének felderítésére ismét egy cianobaktériumot választottunk, mert ott, mint tudjuk, egyrészt megvan a deszaturáz enzimek rendszere, másrészt karotinoid összetételük meglehetősen egyszerű, és meg is változik erős fény hatására (115). Néhány cianobaktérium törzsben a karotinoid szintézis alacsony hőmérsékletek általi indukcióját is kimutatták (116;117).

VI. táblázat: *Cylindrospermopsis raciborskii* sejtek tilakoid membránjainak karotinoid és klorofill tartalma a nevelési hőmérséklet és fényintenzitás függvényében.

tilakoid	$\Sigma_{\text{karotinoid}}$	Klorofill	$\Sigma_{\text{kar}}/\text{Kl}$
hőm./fény	nmol/mg fehérje		arány
RT35/100	42.7 ± 5.2	114.2 ± 23.1	0.37
RT35/400	42.9 ± 5.3	87.4 ± 20.4	0.49
RT25/100	36.1 ± 2.8	64.5 ± 9.1	0.56
RT25/400	42.1 ± 3.9	48.6 ± 7.8	0.87

Az adatok három független mérés átlagát jelentik.

A $\Sigma_{\text{karotinoid}}/\text{Kl}$ arány meghatározás hibája körülbelül 20%.

A kísérletekhez a *Cylindrospermopsis raciborskii* törzset használtuk⁴⁹. A sejteket két hőmérsékleten (25 és 35 C°), és két fényintenzitásnál (100 és 400 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) neveltük, és belőlük tilakoid membránokat izoláltunk⁵⁰, amiket értelemszerűen RT25/100, RT25/400, RT35/100, RT35/400-zal fogok jelölni. Hasonlóan, az ugyanezekhez a sejtekhez tartozó citoplazma membránokat RC25/100 stb.-ként fogom jelölni.

⁴⁹ Ez egy olyan törzs, ami szubtropikus vizekben él, a 25-35 C° közötti hőmérsékleteket kedveli igazán. Jelentős része volt a Balatonban tapasztalt kellemetlen algaburjánzásban, ami a tó vizének tartósan 28 C°-ra melegedésekor következett be. Ennek kapcsán vizsgálták meg közelebbről ezt a baktériumot a Növénybiológiai Intézetben, és néztük meg mi is, milyen szabályzó mechanizmussal rendelkezik, mert a hideget is igen jól bírja, jobban, mint a *Synechocystis* PCC6803. Ezért is lehet jelen a Balatonban (118).

⁵⁰ A mintákat a következőképpen neveztük el: RT=*Raciborskii* tilakoid, utána jön a növekedési hőmérséklet, utána a fényintenzitás, amin a sejtek nőttek. Tehát RT25/400 egy olyan membránt jelöl, ami 25 C°-on és 400 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ fényintenzitásánál nevelt sejtől készült.

Meghatároztuk a sejtek zsírsavösszetételét, amit a [V. táblázat](#) mutat. Látszik, hogy az alacsony hőmérsékleten nevelt sejtekben, ahogy az eddigiek alapján várjuk is, megnő a lipidek telítetlensége.

Ha megnézzük a karotinoid tartalom változását, akkor azt látjuk, hogy egyrészt a fény hatására, másrészt az alacsony hőmérséklet hatására megnő a karotinok klorofillekhez viszonyított mennyisége a sejtekben ([VI. táblázat](#)).

Ha megnézzük, hogy a karotinoidok növekménye mit jelent a poláros és neutrális karotinoidok szempontjából, akkor azt látjuk, hogy a fényintenzitás növekedésének nincs hatása a poláros és neutrális karotinoidok arányára. A hőmérsékletnek viszont van hatása, ha a nevelési hőmérséklet lecsökkent 35 C°-ról 25 C°-ra, akkor több mint duplájára nőtt a poláros/neutrális karotinoid arány ([VII. táblázat](#)).

Ha a poláros/neutrális karotinoidok aránya eltolódásának a membrán szerkezetére gyakorolt hatását akarjuk felmérni, akkor figyelembe kell vennünk, hogy az alacsonyabb hőmérsékleten erősen lecsökkent mennyiségű β -karotin akárhogy állhat a membránban, ezzel szemben a poláros végű mixoxantofilloknak muszáj keresztül feszülnie a membránon, mert poláros végeik poláros környezetet kívánnak. Így aztán ezek a karotinoidok merevíthetik a membránokat, vagy összetarthatják egyes részeit.

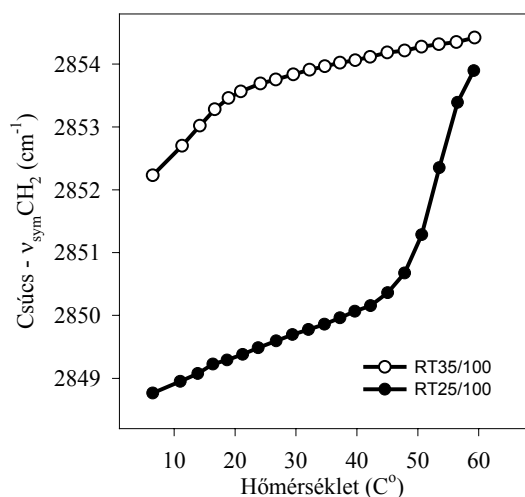
VII. táblázat: A karotinoidok relatív mennyisége 25 vagy 35 C°-on és 100 vagy 400 $\mu\text{Em}^2\text{s}^{-1}$ fényintenzitásnál nőtt *Cylindrospermopsis raciborskii* sejtek tilakoid membránjában.

tilakoid	β -karot. (neutrális)	echinenon	zeaxantin	mixoxantofill (poláros)	Pol./neut.
hőm./fény	relatív %				arány
RT35/100	32	40	2	26	1.2
RT35/400	30	43	2	25	1.2
RT25/100	16	39	2	43	2.7
RT25/400	18	40	1	41	2.8

A karotinok relatív mennyisége meghatározásának hibája körülbelül 15%, a poláros/neutrális arányé kb. 20%. A relatív mennyiségeket az [V. táblázat](#) adatai alapján számoltuk.

Az azonban nem derül ki a fenti adatokból, hogy ha van ilyen merevítő/védő hatás, az az egész membrán szintjén jelenik meg, vagy vannak specifikus membrán tartományok, ahol a hatásnak kitüntetett szerepe van. Erre a kérdésre próbáltunk meg választ keresni a membránok infravörös spektruma C-H rezgési tartományának a különböző hőmérsékleteken és különböző fényintenzitásoknál tapasztalt viselkedéséből.

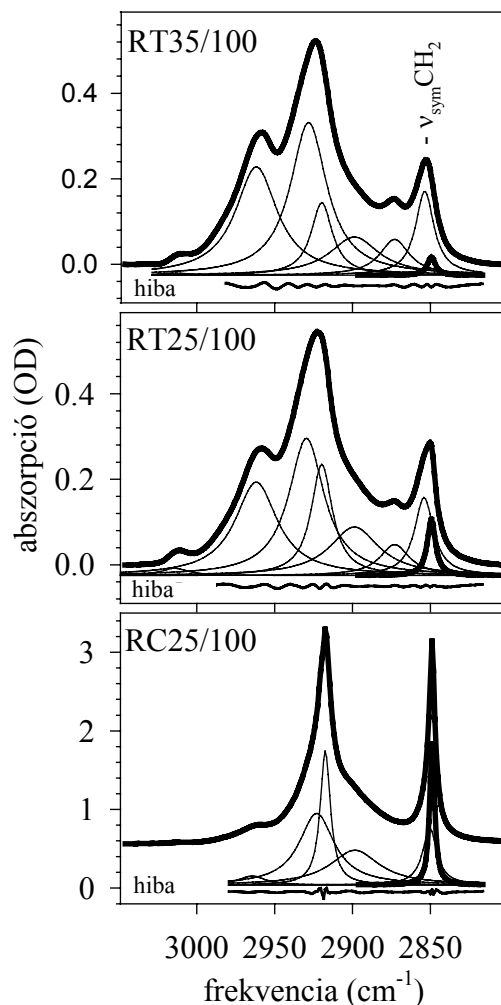
Ha összehasonlítjuk a 25 illetve 35 C°-on nevelt *C. raciborskii* sejtek tilakoid membránja $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ frekvenciájának hőmérsékletfüggését, meglepődünk ([20. ábra](#)).



20. ábra: A $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ frekvencia hőmérsékletfüggése csak a $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ sáv csúcsának helyzete alapján kiértékelve $100 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ fényintenzitásnál 35 C°-on (**RT35/100**), illetve 25 C°-on (**RT25/100**) nevelt *Cylindrospermopsis raciborskii* sejtek tilakoid membránjában. Figyeljük meg, hogy az eredmény látszólag ellentmond az eddigieknek (pl. [10.A. ábra](#)). hiszen a 25 C°-on nevelt sejtek membránja mindenhol merevebb mint a 35 C°-on nevelteké, és csak egészen magas hőmérsékleten (55 C°) mutat valami fázisátmenet félét.

Az ábra szemmel láthatólag ellentmond eddigi állításunknak, miszerint az alacsonyabb hőmérsékleten nevelt sejtek membránjainak lipidjei rendezetlenebbek (lásd pl. [10.A. ábra](#)). Itt a 25 C°-on nevelt sejtek tilakoidjának (RT25/100) $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ frekvenciái végig a 35 C°-on nevelteké (RT35/100) alatt futnak, és csak egészen magas hőmérsékleten mutatnak valami fázisátmenet szerű növekedést. Meg kell jegyezni, hogy ezt az eredményt akkor kapjuk, ha a spektrumokat hagyományos módon a $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ sáv csúcsa frekvenciájának meghatározásával értékeljük ki.

Ha összehasonlítjuk az RT35/100 és az RT25/100 tilakoidok C-H rezgési tartományát ([21. ábra](#)), akkor azt látjuk, hogy mintha valami éles kis csúcs

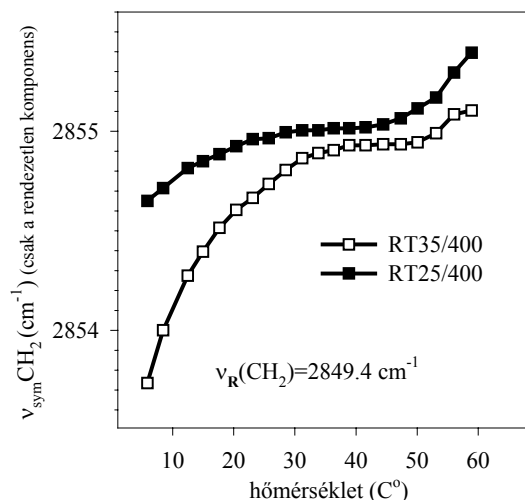


21. ábra: Különböző hőmérsékleteken (35 ill. 25 °C) 100 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ fényintenzitásnál nevelt *Cylinrospermopsis raciborskii* sejtek tilakoid (**RT35/100**, **RT25/100**) és citoplazma (**RC25/100**) membránjának C-H rezgési tartománya, és annak kiértékelése a $v_{\text{sym}}\text{CH}_2$ sáv két komponenssel való illesztésével.

türemkedne ki a $v_{\text{sym}}\text{CH}_2$ sáv alacsony frekvenciájú oldalán. Ez a csúcs aztán a citoplazma membránban (RC25/100) óriásira nő.

Ha ezek után itt is a korábban bemutatott két-komponenses illesztést alkalmazzuk a $v_{\text{sym}}\text{CH}_2$ sávra, akkor a következő eredményt kapjuk ([22. ábra](#)). A két komponens közül az egyik (a korábbiakban rendezettnak nevezett **R** komponens) nagyon merev

zsírsavaknak felelt meg ($\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2 = 2849.4 \text{ cm}^{-1}$). Ha megnézzük, hogy mekkora volt, és hogyan változott a másik, korábban rendezetlennek nevezett **O** komponens frekvenciája, akkor megnyugodhatunk, mert ugyan nem minden világos, de nagy



22. ábra: A $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ sáv rendezetlen komponense frekvenciájának hőmérsékletfüggése 35 C°-on (RT35/400) és 25 C°-on (RT25/400) 400 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ fényintenzitásnál nevelt *Cylindrospermopsis raciborskii* sejtek tilakoid membránjában.

vonalakban helyreállt a „természet rendje”, az RT25/100 $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ frekvenciája mindenütt az RT35/100-é fölött halad, sőt az RT35/100 még egy fázisátmenet szerű jelenséget is mutat az elvárható hőmérséklet tartományban.

Összefoglalva, a fény, és a hőmérséklet együtt határozza meg a fotoszintetizáló élőlények körülményeit, Mindkét faktor lehet hasznos, illetve káros, és ezek az ellentétes hatások függnek nemcsak az adott hőmérséklettől és fény intenzitástól, hanem ezek egymáshoz viszonyított arányától is.

A lipideknek leginkább a hőmérsékleti stresszel való alkalmazkodásban van szerepük, de az azt lehetővé tevő deszaturáz rendszer a hőmérséklet mellett a fény által is szabályozott (119). A telítetlen lipidek ugyancsak kellenek egy fény okozta károsodás, az alacsony hőmérsékleti fotoinhibíció kijavításához (120).

A xantofilok a fény okozta károk elleni védekezésben fontosak, de védő hatásuk erősen függ a membrán dinamikájától, ami hőmérsékletfüggő.

Mi itt azt vizsgáltuk, hogyan függ össze a membrándinamika (lipid deszaturáció) és a xantofill termelés, különböző hőmérsékleteken és fényintenzitásoknál, *Cylindrospermopsis raciborskii* sejtekben.

Azt láttuk, hogy a deszaturáz rendszer nagyon jól működik ([V. táblázat](#)), azaz a membránok adaptálódnak az alacsony hőmérséklethez. Az infravörös spektrumokban ez az adaptáció csak azután volt felismerhető, ha eltekintettünk egy igen rendezett komponens (amit mi a karotinoidok merevítő hatásának tulajdonítunk) jelenlététől.

Ami a karotinoidokat illeti, azok abszolút mennyisége nem, a poláros/neutrális karotinoidok aránya viszont erősen megnőtt az alacsonyabb hőmérsékleten nevelt sejtekben, de az adott hőmérsékleten nem változott a fényintenzitás függvényében. Így annak ellenére, hogy lecsökkent a β -karotin aránya a karotinokon belül, a β -karotin fényvédő szerepe megmarad, hiszen a klorofillokhoz viszonyított mennyiség még látványosan meg is nőtt alacsony hőmérsékleten magas fényintenzitáskor. Ez az eredmény megfelel annak a feltételezésnek, hogy a tilakoid membrán alacsony hőmérsékleten lecsökkent dinamikája korlátozza a védőanyagok (mint pl. a β -karotin) mozgását, ezért azokból több kell.

A karotinoidokon belüli változás leginkább a β -karotin csökkenését, és a mixoxantofill növekedését jelenti. A β -karotin akárhogy állhat a membrán apoláros részében, így a membrán szerkezetre gyakorolt hatása a koleszterinére hasonlít, a fázisátmeneti hőmérséklet alatt növeli, fölötté pedig csökkenti a zsírsavláncok rendezetlenségét. Ezzel szemben, a mixoxantin poláros végcsoportjai miatt csak a membrán síkjára merőlegesen tud állni, poláros csoportjai éppen kiérnek a vizes fázisba, így merevíti a membránt. Erre eddigi ismereteink szerint nincs semmi szükség alacsony hőmérsékleten, sőt a lipid deszaturáció éppen ellenkező irányban dolgozik.

A két-komponenses $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ sáv analízis szerint nincs is az egész membránra kiterjedő merevítő hatása a poláros karotinoidoknak. A rendezetlen membrán komponensek ugyanúgy viselkedtek itt is, mint más membránokban. Mi azt gondoljuk, hogy a poláros karotinoidok kisebb-nagyobb csoportokban helyezkednek el, és ott valóban merevítik helyileg a membránokat. Egy ilyen helyi hatásnak az lehet a szerepe, hogy alacsony hőmérsékleten a membránban keletkező nagyobb

menyiségű szabad gyöktől (121) megvédje a fotoszintetikus apparátust. Elképzelhető, hogy „gazdaságosabb” a hozzáférés meggátolásával megvédeni helyileg valamelyik értékes membrán komponens, mint a javításra, új molekulák szintézisére hagyatkozni az amúgy „szűkös”, energiaszegény alacsony hőmérsékleti körülmények között. A poláros karotenoidok membrán merevítő hatásuk révén alkalmasak lehetnek egy ilyen szerepre.

Membránfizikai problémák:

LIPID-FEHÉRJE KÖLCSÖNHATÁSOK

Amikor a $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ sáv két-komponenses illesztését kidolgoztuk, az első példában a két komponens valamennyi paraméterét fixen tartottuk az illesztés során (53). De ha belegondolunk a finomabb részletekbe, akkor elképzelhető egy további közelítő lépés is. Nevezetesen, hogy a rendezett szegmenseknek megfelelő **O** komponens minden paraméterét fixen tartjuk a hőmérséklet függvényében felvett spektrumok kiértékelése során, azzal érvelve, hogy ez egy olyan komponens, ami fokozatosan „elolvad”, azaz bármilyen változás innen csak egy másik állapotba való átmenettel lehetséges.

Az a másik állapot azonban, amibe a rendezett szegmensek átmennek a hőmérséklet hatására, már lehet igencsak heterogén. A *Synechocystis* membránoknál, a fehérje/lipid arány kapcsán megtárgyaltuk, hogy a membránokban a zsírsavláncok töredezettségének, rendezetlenségének, kétféle oka lehet. Az egyik a „szerkezeti rendezetlenség” ami abból fakad, hogy a zsírsavláncoknak a lipid-fehérje határfelületen meg kell felelniük a fehérje felületének, a másik a „termikus rendezetlenség” amit az adott zsírsavösszetétel és hőmérséklet határoz meg. Ezért aztán számíthatunk arra, hogy ennek a heterogén rendezetlen zsírsav populációnak változik az eloszlása a hőmérséklet függvényében.

Mivel a heterogenitás egyrészt a lipid-fehérje kölcsönhatásból származik, számíthatunk arra, hogy a lipid-fehérje kölcsönhatás megváltozása tükröződni fog a

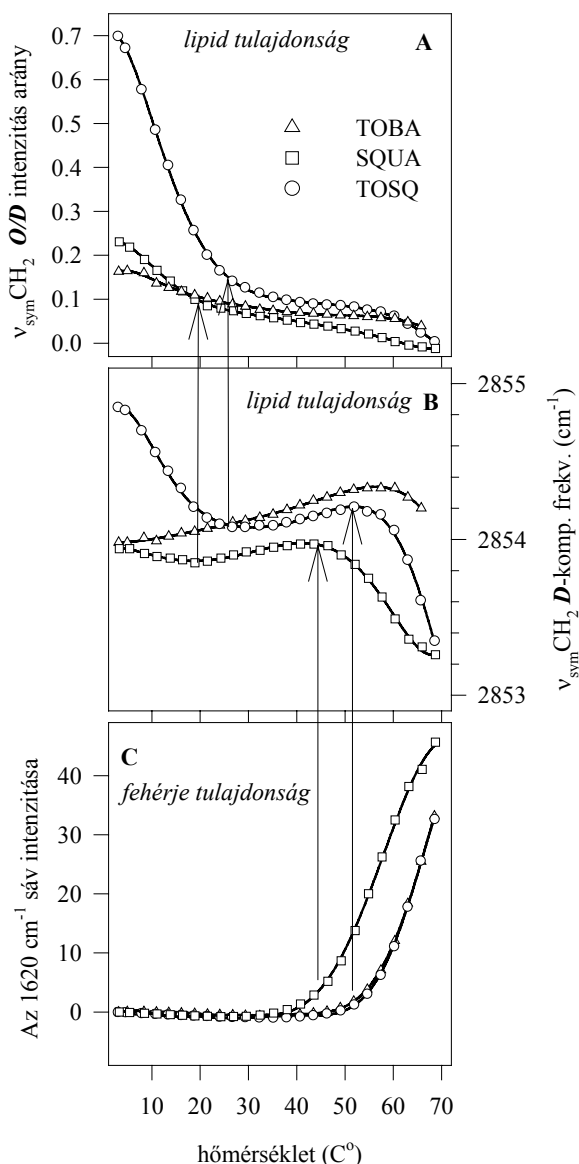
rendezetlen populáció eloszlásában. Erről meg is bizonyosodhatunk, ha a C-H rezgési tartományban esetleg fellépő változásokat összevetjük a csak fehérje rezgésekből álló amid I sáv változásával.

Ha összehasonlítjuk a dohány (TOBA), a transzgenikus dohány (TOSQ), (ami mint korábban tárgyaltuk a tök GPAT enzimjének génjét tartalmazza, és ezért foszfatidil- glicerol molekuláinak zsírsavai telítettebbek, mint a TOBA-é) és a tök (SQUA) $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ sávja rendezett (**O**) és rendezetlen (**D**) komponenseinek viselkedését, akkor a [23. ábrán](#) látató eredményeket kapjuk.

A [23.A. ábra](#) görbéi ismerősek a [17. ábráról](#) azzal a kivétellel, hogy itt harmadikként a másik „szülő”, a tök **O/D** aránya van ábrázolva a dohány és a transzgenikus dohány mellett. Látszik, hogy a SQUA görbéjében is megjelenik egy töréspont, bár sokkal gyengébben, mint a TOSQ esetében.

A [23.B. ábra](#) a **D** komponens frekvenciájának hőmérsékletfüggését mutatja, jelentős különbségeket feltárva a három növény között. A TOBA **D** komponensének frekvenciája lassan emelkedik majdnem a hőmérséklet tartományvégéig, ahol valamelyest letörik a görbe. Ezzel szemben a SQUA, és különösen a TOSQ esetében a **D** komponens frekvenciája kezdetben csökken, azután enyhén növekszik, a végén mindkettő ismét elkezdi csökkenni, de valamelyest különböző hőmérsékleteken.

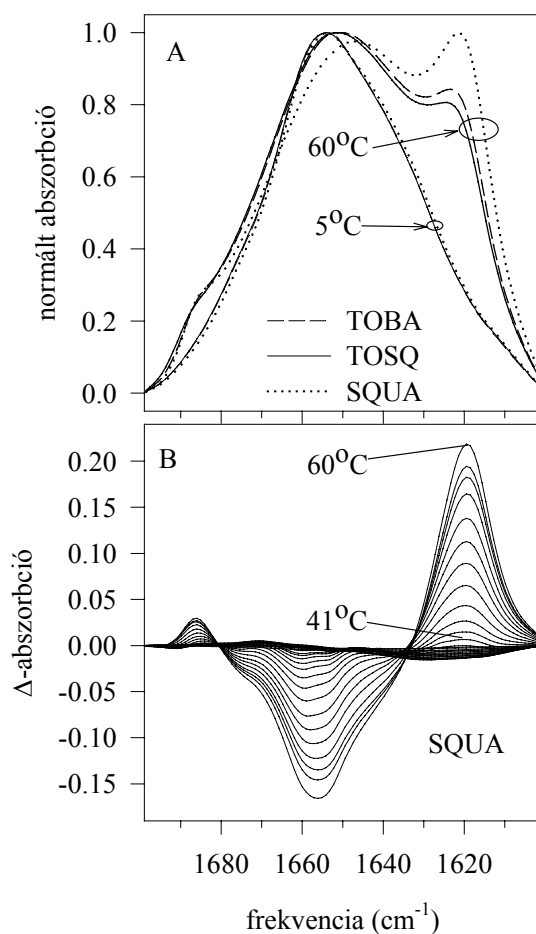
Első ránézésre különösen a frekvencia kezdeti csökkenése a meglepő. De ha összehasonlítjuk a **D** frekvenciák minimumait az **O/D** arányok töréspontjaival, akkor tökéletes egyezést kapunk, azaz a **D** frekvenciája addig csökken, amíg az összes **O** komponens el nem „olvadt”. Ez a jelenség kicsit hasonló ahhoz, mint amit jég-víz keverék melegítésekor tapasztalunk. Ott is, amíg van jég az elegyben, hiába melegítjük az elegyet, annak hőmérséklete nem fog emelkedni, 0 °C marad. Itt arról van szó, hogy alacsony hőmérsékleten a rendezetlen lipid szegmensnek elsősorban a lipid-fehérje határfelületen vannak. A hőmérséklet emelésével ehhez az igen rendezetlen populációhoz olvadnak hozzá egy-egy *gauche* szegmens megjelenésével újabb zsírsavlánckok. De ezek a láncok távolról sem olyan rendezetlenek, mint az eredetileg ott levők. Mivel a jel/zaj viszony, illetve a spektrális felbontás korlátai miatt nem tudjuk a rendezetlen **D** populációt további alcsoportokra felbontani, együtt mérjük a legalább kétféle zsírsavból álló populációt. Ezért aztán, amíg van



23. ábra: A lipid és a fehérje dinamika közti korreláció dohány (TOBA), transzgenikus dohány (a tök GPAT enzim génjével transzformálva, hogy a foszfatidil glicerol molekulák zsírsavai telítettebbek legyenek) (TOSQ), és tök (SQUA) tilakoid membránjában. A $v_{\text{sym}}\text{CH}_2$ sávot két komponensre, a rendezett szegmenseket tükröző (O) és a rendezetleneket tükröző (D) komponensre bontottuk fel. A két komponens intenzitás arányának hőmérsékletfüggését mutatja az A panel, a D komponens frekvenciájának hőmérsékletfüggését a B panel. A C panelen a fehérjék amid I sávjának a fehérje denaturációra jellemző 1620 cm⁻¹ körüli komponensének intenzitása szerepel szintén a hőmérséklet függvényében.

utánpótlása a „hideg”, éppen csak hogy rendezetlenné vált zsírsavaknak, addig nem fog növekedni, sőt, ha sok van belőlük, akkor csökkenni is fog a **D** populáció átlagos frekvenciája. Amint az utánpótlást adó **R** populáció elfogyott, megindulhat az egész **D** populáció lassú „melegedése”, ami a *gauche* szegmensek mennyiségének növekedésében és így a **D** frekvencia lassú emelkedésében nyilvánul meg.

Ha ezt a magyarázatot elfogadjuk, akkor valami hasonló mechanizmust kell keresnünk a **D** komponens frekvenciájának magas hőmérsékleten most már mindhárom növényben megfigyelt csökkenése mögött is, csak hát tekintettel a magas hőmérsékletre, a kiváltó oknak valami egészen másnak kell lennie.



24. ábra: **A** - Az amid I sáv dohány (TOBA), a tök GPAT génjével transzformált dohány (TOSQ) és tök (SQUA) tilakoid membránban alacsony és magas hőmérsékleten. **B** – Az amid I sáv differencia spektruma tökben, ha az 5 C°-on felvett első spektrumot kivonjuk a hőmérséklet sorozat későbbi spektrumaiból. Az 1620 és 1684 cm^{-1} körül a hőmérséklettel felövő sávok a molekulák denaturációkor fellépő aggregáció során kialakuló inter-molekuláris β -szerkezetre jellemzőek. Az 1620 cm^{-1} körüli sáv intenzitását (azaz integrálját) használtuk fel a denaturáció fokának mérésére. Az amid I sávok amplitúdóra való normalizálása, ahogy az ábrán látszik, csak a szemnek szól, a differencia spektrumokat olyan amid I sávokból képeztük, amelyek a területükre voltak normálva.

Mi a kiváltó ok tekintetében a fehérjékre gondoltunk⁵¹, mert ezen a hőmérsékleten már bekövetkezhet denaturációjuk. E tekintetben biztosan támaszkodhatunk a fehérjék amid I sávjára, amit a három különböző növényre a [24. ábrán](#) mutatok alacsony és magas hőmérsékletre.

Az amid I sávok nagyon nagyfokú hasonlósága alacsony hőmérsékleten az első dolog, ami az ábrán szembetűnik. Ez nem garancia arra, hogy a minden egyes fehérje ugyanaz, és ugyanolyan szerkezetű a különböző növényekben, de az összegek – ez az amit az infravörös spektrum mutat - hasonlósága jó kiindulópont a tekintetben, hogy ha látunk majd különbségeket köztük, akkor annak oka inkább a lipid-fehérje kölcsönhatásbeli különbségben, mintsem a fehérjék közötti különbségben lesz keresendő.

Az amid I tartomány 60 C°-on TOBA és TOSQ esetében hasonló, SQUA esetében sokkal erősebb az 1620 cm⁻¹ körül megjelenő új sáv ([24.A. ábra](#)). Ez a sáv a fehérje denaturáció során fellépő aggregációkor jelentkezik, és az ilyenkor kialakuló inter-molekuláris β -szerkezethez rendelhető (122).

Az inter-molekuláris β -szerkezet kialakulása jó mértéke a fehérje denaturáció előrehaladásának, ezért ennek meghatározására az első, 5 C°-on felvett infravörös spektrumnak a magasabb hőmérsékleteken felvett spektrumokból való kivonásával egy különbségi sorozatot képeztünk ([24.B. ábra](#)), amiben meghatároztuk az 1620 cm⁻¹ körüli sáv intenzitását a hőmérséklet függvényében [[SS](#)] (123). A három növényt e tekintetben összehasonlítva a [23.C. ábrán](#) látható eredményt kaptuk.

A TOBA és a TOSQ denaturációjának hőmérsékletfüggése és a denaturáció mértéke nagyon hasonló⁵². A SQUA viszont alacsonyabb hőmérsékleten kezd el denaturálódni, és ennek megfelelően, ugyanazon a véghőmérsékleten denaturációjának mértéke is nagyobb. Ami a nagyon érdekes, hogy a denaturáció - egy tisztán fehérjékre jellemző jelenség - beindulásának hőmérséklete ([23.B. ábra](#)) tökéletesen egybeesik a $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ sáv rendezetlen zsírsavlánc szegmenseket

⁵¹ Mint látni fogjuk ez egy tyúk/tojás probléma, a fehérjék és a lipidek egymásra hatásáról van szó, de hogy melyik az ok, és melyik az okozat, azt egyelőre nem tudjuk megmondani.

⁵² A denaturáció mértéke azért hasonlítható össze, mert az 1620 cm⁻¹ sáv intenzitását területre normált amid I sávokból végeztük. Ez a normálás feltételezi, hogy a különböző fehérje másodlagos szerkezetek extinkciós együtthatója ugyanakkora, de jobbat nem tudtunk tenni.

reprezentáló **D** komponensének – egy tisztán lipidekre jellemző jelenség – frekvenciájának lecsökkenésével ([23.C. ábra](#)).

A **D** komponens frekvenciájának itteni csökkenését az **O** komponens elolvadásával egybeeső, az előzőekben már megtárgyalt csökkenéséhez hasonlóan gondoljuk megmagyarázni. Itt szerintünk arról van szó, hogy a fehérjék aggregációjakor lecsökken a fehérje-lipid határfelület, ezért lipidek szorulnak ki erről a határfelületről a tiszta lipid fázisba. Ezek a lipidek a fehérje-lipid határfelületen igen rendezetlenek voltak, ehhez képest, meg ezen a magas hőmérsékleten is rendezettebbek lesznek a tiszta lipid fázisban, ezért a rendezetlen lipid populáció (a **D** komponens) átlag frekvenciája lecsökken⁵³.

Összefoglalva, a lipid-fehérje kölcsönhatás vizsgálata több dologra is rávilágít. Egyrészt, a membrán lipid részének dinamikája alacsony hőmérsékleten igen függött a lipid összetételtől, nemcsak a különböző növények között ([23.A. ábra](#)), hanem a vad típusú és a transzgenikus dohányok között is ([17. ábra](#)). Másrészt, magas hőmérsékleten a fehérje denaturáció különböző volt a különböző növényekben ([23.C. ábra](#)) és ([[S5](#)] [5. ábra](#)), de azonos volt a vad típusú és a transzgenikus dohány növényekben ([23.C. ábra](#)) és ([[S5](#)] [2.C. ábra](#)).

Ez a különböző növények esetében azt jelentheti, hogy azért van különbség a fehérje denaturációban, mert (i) a fehérjéik is különbözőek, (ii) mert a lipid összetételük (esetleg egyéb membrán összetevőik, pl. karotinok) különbözőek. Az első lehetőséget gyengíti az amid sávok nagyon hasonló alakja alacsony hőmérsékleten.

A transzgenikus dohányok esetében az lehet a helyzet, hogy azért nem kapunk különbséget a fehérje denaturációban, mert (i) a fehérjéik azonosak (ezt tudjuk, hogy igen valószínű, hogy igaz), (ii) mert a lipid összetételük azonos (ezt tudjuk, hogy a PG kivételével igaz, és a PG-nek volt is hatása az alacsony hőmérsékleti fotoinhibícióra). Ezek szerint, ha a PG nem olyan helyen van a membránban, hogy befolyásolja a fehérjék körülményeit, vagy ha olyan helyen van is, akkor magas

⁵³ Valószínű, hogy a fehérje denaturáció teljes végbemenetele után a frekvencia ismét növekedni kezdene, de ezt egyelőre nem vizsgáltuk.

hőmérsékleten, ahol a fehérje denaturáció zajlik, nem számít, hogy a PG zsírsavláncai mennyire telítettek.

Ha a kétféle kombinációt összehasonlítjuk, és felidézzük eredeti kérdésünket, hogy a fehérjék vagy a lipidek-e a meghatározóak a membrán dinamikában, akkor ebben a kísérletben, eddig a pontig, az látszik valószínűbbnek, hogy a lipid környezet határozza meg a membránfehérjék dinamikáját, illetve a fehérje dinamika határán túlhaladva, kellően magas hőmérsékleteken, a fehérjék stabilitását. Eddig csak a denaturációra mutattam be adatokat, de munkám során tettem kísérletet arra is, hogy megnézzem, milyen dinamikai változásokon keresztül jutnak el a denaturációig a membránfehérjék, és mik ebben a meghatározók, ők maguk, vagy a membrán lipidjei?

A LIPID-FEHÉRJE KÖLCSONHATÁS DINAMIKÁJA

A nehézfém ionok hatása a tilakoid membránok dinamikájára [S8]

A lipid-fehérje kölcsönhatás vizsgálatát egy viszonylag korai munkánkban kezdtük el [S8] (124), ami ennek megfelelően jelentős visszhangot is váltott ki, itt azonban csak röviden ismertetem, mert azóta sokat finomítottunk kiértékelési módszereinken. A munka itt bemutatandó része egy biológiai problémához kapcsolódik, a biológiai probléma az volt, hogy ismeretes, a legtöbb nehézfém ion mérgező hatású a fotoszintetizáló élőlényekre, de egyáltalán nem volt nyilvánvaló, hogy ezek az ionok hol, és milyen módon fejtik ki hatásukat.

Az *in situ* biológiai vizsgálatok (a nehézfém ionokat izolált, de fotoszintetikusan még aktív tilakoid membránokhoz adtuk) azt mutatták, hogy a vizsgált öt nehézfém ion közül a Cd és a Ni nem volt jelentős hatással a fotoszintetikus elektron transzportra, a Cu, az Pb és a Zn viszont erősen gátolta a II. fotoszisztéma működését (Ezeket az eredményeket társszerzőink, Droppa Magdolna, és a probléma felvetője

Horváth Gábor⁵⁴ fluoreszcencia indukciós mérésekből kapta). A nehézfém ionok szerkezeti hatását három tekintetben vizsgáltuk, (i) a fehérjék másodlagos szerkezetét, (ii) a lipid fázis viszonyait mérve infravörös spektroszkópiával, és (iii) a fehérje-lipid határfelszínt feltérképezve spin-jelölő ESR spektroszkópiával⁵⁵.

Ha a lipidekre jellemző infravörös spektroszkópai paramétert (a ν_{symCH_2} sáv frekvenciáját) megnézzük ([S8], 2. ábra), akkor azt látjuk, hogy a nehézfém ionok mind valamilyen merevítő hatást gyakorolnak a membránokra, de nem találtunk bizonyítható elemspecifitást.

Ami a fehérjéket illeti, a Cd és a Ni nem hatottak hődenaturációjuk menetére. A hődenaturációt az α -hélix (1656 cm^{-1}) tartalom csökkenése, a rendezetlen tartalom (1651 cm^{-1}) párhuzamos növekedése, a β -szerkezetek (1636 cm^{-1}) csökkenése és az inter-molekuláris β -szerkezet (1621 cm^{-1}) növekedése jellemezte ([S8], 5. ábra). A Cd-mal és a Ni-lel ellentétben, a Cu és a Zn fékezte az inter-molekuláris β -szerkezet megjelenését. Az Pb valahol félúton volt a hatástalan és a hatásos fémionok között.

Úgy tűnik tehát, hogy a hatásos nehézfém ionok korlátozzák a tilakoid membrán fehérjéinek aggregációra való hajlandóságát a hődenaturáció során. Ez az információ önmagában nem sokat ér, mert a növények nem hődenaturálódnak, amikor *in vivo* nehézfém ionokkal találkoznak. A kép teljessé tételéhez ESR spektroszkópai vizsgálatok is kellettek, amik kimutatták, hogy a Cu, az Pb és a Zn megnöveli azt a lipid frakciót, amelyik a fehérjéket szolvatálja. Azaz, ezek az ionok szobahőmérsékleten megnövelik a lipid-fehérje kölcsönhatások felszínét, ami nyilván csak bizonyos fehérje komplexek disszociáltatásával lehetséges (amit magában sem az infravörös, sem az ESR spektrum nem mutat ki), és az így jól „bezsírozott” molekulák kevésbé lesznek hajlamosak aggregálódni⁵⁶, mint azt az infravörös spektroszkópai eredmények mutatták is.

⁵⁴ Neki nagyon sokat köszönhetek elsősorban a magasabb rendű növényeken végzett munkákkal kapcsolatban, de minden egyéb tekintetben is számítani lehetett tanácsaira, óriási ismeretanyagára, élénk diskusszióira. Korai halála nagy veszteség volt számomra is.

⁵⁵ Az ESR vizsgálatokat Horváth László végezte, akinek szintén sokat köszönhetek, és akit súlyos betegsége miatt már nagyon hosszú ideje nélkülöznünk kell.

⁵⁶ Persze, végül aggregálnak majd ezeknek a membránoknak a fehérjei is, de mi nem növeltük addig a hőmérsékletet.

A membrán szerkezet szempontjából korábban felvetett tyúk/tojás dilemma teintetében, nevezetesen, hogy a fehérjék vagy a lipidek dinamikája-e az elsődleges a membrándinamika kialakításában, ez a kísérlet kétségek közt hagy bennünket. Elsődlegesen valószínűleg a fehérje komplexekben változtattunk meg valamit a nehézfém ionokkal, ettől viszont megváltozott a fehérje-lipid kölcsönhatásnak nem a természete, csak a mértéke, és ezután nem volt ugyanolyan a fehérje denaturáció. A lipidek szerepét viszont nem tudtuk egyértelműen megállapítani, mert a minden nehézfém ion esetében megjelenő rendezettség növekedést nem tudtuk olyan pontossággal megmérni, hogy kiderülhetett volna a különböző ionok eltérő mértékű hatása. A rendezettség növekedés amúgy beleillik a fentebb felvázolt mechanizmusba.

A kérdés biológiai részére, a nehézfém ionok mérgező hatására azt tudtuk válaszolni, hogy a nehézfém ionok károsító hatása elem specifikus, a Cu, a Pb és a Zn a tilakoid membránban levő fotoszintetikus apparátussal hatnak kölcsön, ezzel szemben a Cd és a Ni a növények egyéb metabolikus folyamatait károsítják.

A lipidekre, illetve a fehérjékre jellemző paraméterek hőmérsékletfüggésének összehasonlítása⁵⁷

Ha áttekintjük az infravörös spektrumnak szerkezetvizsgálatok céljára az eddigiekben felhasznált tartományait, akkor azok a következők voltak:

A $3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$ a C-H nyújtási rezgések tartománya, ezen belül felhasználtuk a $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ rezgés frekvenciáját, finomabb esetekben a sávot két komponensre bontottuk, és a komponenseket, vagy arányukat használtuk fel. Ez a sáv a lipidek zsírsavláncainak átlagos rendezetlenségéről nyújt információt.

Az amid I sávot, $1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ között, a fehérjék másodlagos szerkezetének jellemzésére, e tekintetben eddig szó esett α -hélixekről (1656 cm^{-1} körül), β -redőzött

⁵⁷ Ezek eddig még nem publikált, mostanában végzett kutatások.

szerkezetekről ($1625\text{-}1640\text{ cm}^{-1}$ körül) és a fehérjék denaturációját jellemző inter-molekuláris β -szerkezetekről ($1610\text{-}1620\text{ cm}^{-1}$ között).

Az $1740\text{-}1725\text{ cm}^{-1}$ -nél levő észter C=O kötés sávját, ami tisztán a lipidekhez rendelhető, a fehérje/lipid arány jellemzésére használtuk. Ezen kívül, ezt eddig nem említettük, ez a sáv érzékeny a lipidek konformációjára is (125). Mivel az észter csoportok a membrán felszínéhez közel helyezkednek el, az ottani viszonyokról tudósít a sáv megváltozása.

Ha megnézzük, hogy ez a három tartomány hogyan viselkedik a hőmérséklet függvényében, és a kapott eredményeket egybevetjük, akkor igen szemléletes képet kaphatunk a membrándinamikáról, a fehérjék lehetőségeiről a membránban ([25. ábra](#)).

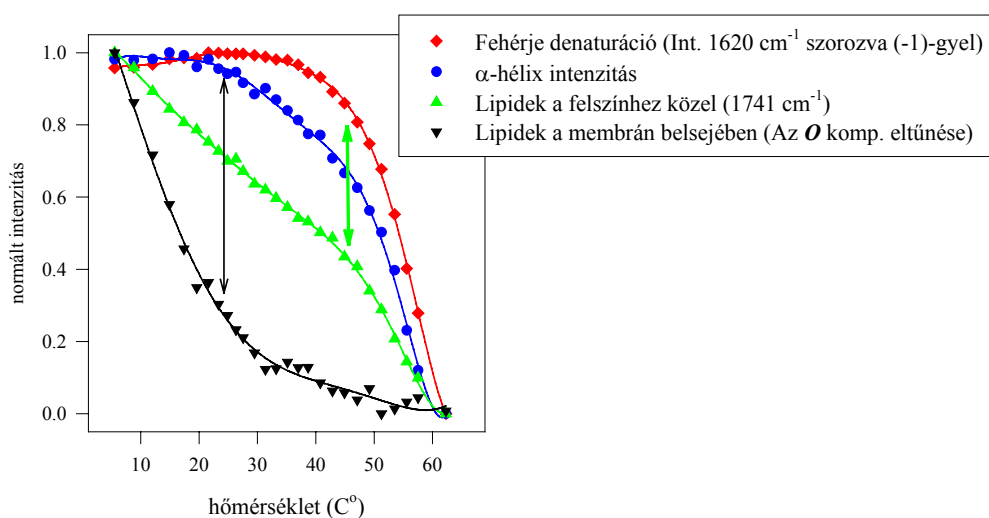
Az ábrán a *Synechocystis* PCC6803 tilakoid membránjának fehérjeit illetően az látszik, hogy a hőmérséklet növekedésével, kezdetben semmi nem történik, azután beindul az α -hélix tartalom valamelyes csökkenése⁵⁸. Itt még a reverzibilis fehérjeszerkezet változások tartományában vagyunk, nincsen szó a fehérje denaturációjáról. Amikor, $45\text{-}50\text{ C}^{\circ}$ -körül, beindul a fehérje denaturáció, akkor az α -hélix tartalom csökkenése felgyorsul.

A lipidekre jellemző paraméterek közül, a láncok átlagos rendezetlenségét mutató, tehát a membrán keresztmetszetének egész hidrofób régiójáról tudósító **O** komponens intenzitása kezdetben meredeken csökken, aztán a csökkenés egy töréspont után nagyon lelassul. Ez azt jelenti, hogy a gél→folyadékkristályos fázisátmenet végbement, a membránban a rendezetlen zsírsavláncok dominálnak, a rendezettek jellemző **O** komponens intenzitása nem számottevő. Figyelemreméltó, hogy ez a töréspont, ami a folyadékkristályos fázis uralkodóvá válását jelzi, egybeesik a fehérjékben a mozgások lehetőségének megjelenésével, az α -hélix tartalom valamelyes változásának kezdetével ([25. ábra](#)). Az **O** komponens fogyását mutató görbe lefutása azonban nem mutat változást a fehérjék denaturációjának

⁵⁸ Nem egészen biztos, hogy itt valódi α -hélix tartalom csökkenésről van szó, a változások a kezdeti stádiumban igen kicsinyek, inkább csak annak jelzői, hogy a fehérjék mozogni kezdtek.

megindulásakor. Leginkább azért nem, mert gyakorlatilag nincs is ott már az **O** komponensből.

Ezzel szemben, az észter C=O kötésből származó 1741 cm^{-1} -nél levő sáv intenzitásának hőmérsékletfüggésében nincs töréspont a gél→folyadékkristályos átmenetnél (ez nyilván nem nagyon érződik a változatlanul maradó poláros



25. ábra: Synechocystis PCC 6803 sejtek (nőttek $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on) tilakoid membránjának dinamikája a lipideket, illetve a fehérjéket érintő változások összevetésével. Minden változás intenzitás változás volt, amelyeket normalizáltam. Az 1620 cm^{-1} -nél levő, a fehérje denaturációra jellemző csúcs intenzitása nő a hőmérséklettel, azt a jobb összevethetőség érdekében megszoroztam (-1)-gyel. Vegyük észre, hogy az α -hélix tartalom változása a membrán belsejének rendezetlenebbé válása után lehetséges (az **O** komponens gyors fogyása véget ér)(**fekete nyíl**). Az α -hélix tartalom változása jó darabig nem jár a fehérje denaturációjával. Amikor a denaturáció is beindul, az α -hélix fogyása felgyorsul, és ezt már a membrán felszín közeli észter C=O csoportok is észreveszik (**zöld nyíl**).

membránfelszín közelében), de töréspont jelenik meg a fehérjék rohamos denaturációjának megindulásakor (a membrán fehérjék denaturációja, ami a membrán belsejében, a hidrofób fázisban indul, később eléri a membrán felszínét is).

Összefoglalva, ha összehasonlítjuk a fehérjékre, illetve a lipidekre jellemző spektrális paraméterek hőmérsékletfüggését, ami eddig tudtommal az irodalomban még nem történt meg, akkor direkt bizonyítékot szerezhetünk arra, hogy a fehérjék

reverzibilis szerkezetváltozásainak⁵⁹ lehetővé tétele érdekében van szükség a membránban rendezetlen lipid fázisra, ami a folyadékkristályos állapotban meg is valósul.

A lipid fehérje kölcsönhatás tanulmányozása H→D kicserélődéssel⁶⁰

Fehérjék esetében, mint azt az Irodalmi áttekintésben is említettem, a H→D kicserélődés sebességének mérése nagyon régen használatos módszer a molekulák dinamikájának⁶¹ felderítésére. A főbb változások, amikre a fehérjék infravörös spektrumában H→D kicserélődés következtében számítani lehet, (i) az amid I sáv, illetve komponenseinek néhány hullámszamos eltolódása az alacsonyabb frekvencia értékek felé, (ii) az 1550-1540 cm⁻¹-nél levő amid II sáv fokozatos eltűnése, ami a sáv kb. 100 hullámszámmal lefele való eltolódása miatt következik be, (iii) a deuterált amid II' sáv fokozatos megjelenése 1450 cm⁻¹ körül.

A membránfehérjék esetében a helyzet komplikáltabb. Van a fehérjéknek egy része, ami kilóg a vizes fázisba, ott a H→D kicserélődés a vízőldékony fehérjékéhez hasonló módon megy végbe. A membrán belsejében levő fehérje részekhez azonban a külső környezetből a víz vagy a nehézvíz csak korlátozottan tud hozzáférni. Ha a membránokat nehézvízbe tesszük, akkor szobahőmérsékleten nagyon sokáig megmarad az amid II sáv, a teljes kicserélődéshez a hőmérséklet emelésére van szükség, egészen a fehérjék denaturációjáig, mint azt a [26. ábrán](#) is láthatjuk.

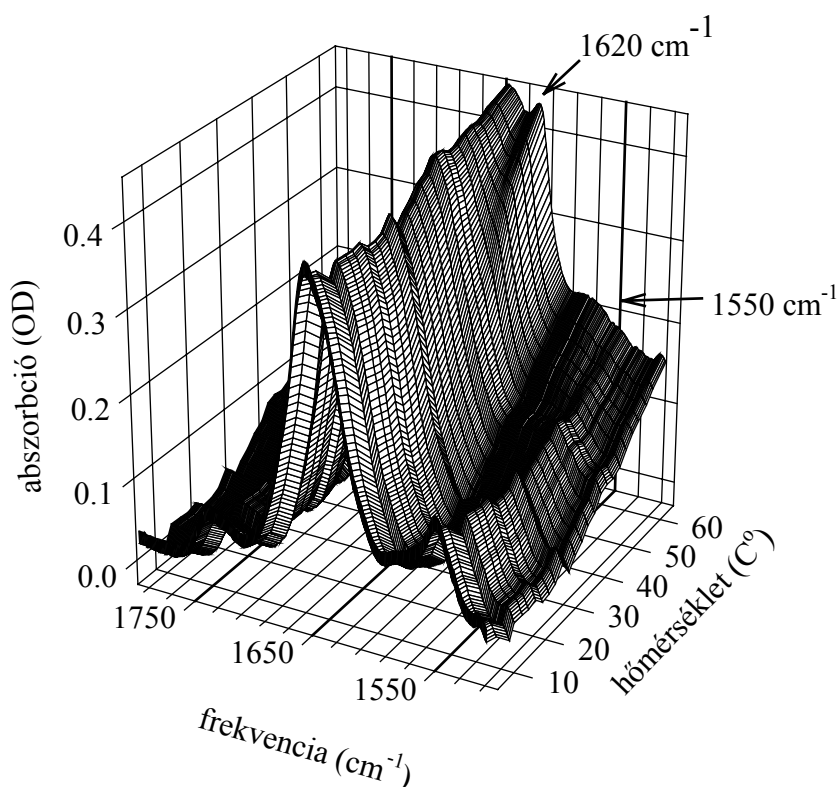
Egy ilyen kísérletben mindig két tényező, az idő és a hőmérséklet keveredik. Ráadásul itt az idő mondjuk így, „történelmi”, azaz, ami egyszer megtörtént, az nem ismételhető. Amelyik H atom kicserélődött D atomra, az már nemigen fog visszacserélődni, amíg a deutérium óriási fölöslegben van jelen. Legelőször a

⁵⁹ Ez nem zárja ki, hogy olyan szerkezet változásokat látunk, amik pl. a fehérjék membránbeli diffúziója során lépnek fel. A lényeg az, hogy ezek a szerkezetváltozások nem járnak denaturációval. Természetesen, ilyenkor a β -szerkezet is változik, mégpedig ellenkező irányban, mint az α -hélixek, és azonos hőmérsékletfüggés szerint, csak nem akartam túlzásfólni a [25. ábrát](#).

⁶⁰ Ugyancsak egészen új eredmények, még csak előadásokban szerepeltek.

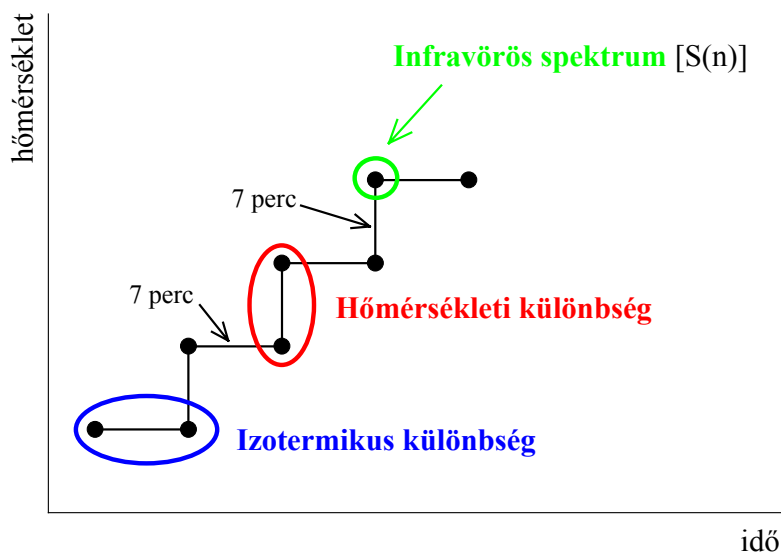
⁶¹ Az infravörös spektroszkópia és a dinamika eddig emlegetett közvetett kapcsolatával szemben itt tényleg, közvetlenül a molekula dinamikáját mérjük.

legkönnyebben hozzáférhető H-atomok cserélődnek ki, aztán fokozatosan az egyre nehezebben hozzáférhetők. Ahogy az idő halad, mindig más és más atomok kicserélődését látjuk. A visszacserélődés valószínűsége, amíg a D atomok óriási fölöslegben vannak jelen, igen csekély. Ezért pl. az egy adott időintervallumban kicserélődő H-atomok száma egészen különböző lehet, ahogy az idő múlik, attól függően, hogy hol tartunk az egész kicserélődési folyamatban.



26. ábra: Borsó tilakoid membrán fehérjéinek denaturációja és H→D kicserélődése a hőmérséklet függvényében. Az 1620 cm⁻¹-nél megjelenő sáv a fehérje denaturációra jellemző. Az 1550 cm⁻¹ körül levő amid II sáv eltűnése (ami, vegyük észre, a fehérje denaturációval párhuzamosan gyorsul fel) a H→D kicserélődés mérője.

Megpróbáltam egy olyan mérést tervezni, ahol figyelembe tudom venni mind a hőmérséklet, mind az idő „történelmi hatását” a H→D kicserélődésre. Tudatában vagyok, hogy többféle elrendezést kell még majd kipróbálni, de már az első próbálkozások nagyon érdekes eredményeket hoztak. A kísérlet sémáját a [27. ábra](#) mutatja.



Különbségi sorozat: $D(n) = S(n+1) - S(n)$

$D(n)$ $n=1,3,5,\dots$ Izotermikus kül. a H/D kicserélődésben

$D(n)$ $n=2,4,6,\dots$ Hőmérsékleti kül. a H/D kicserélődésben

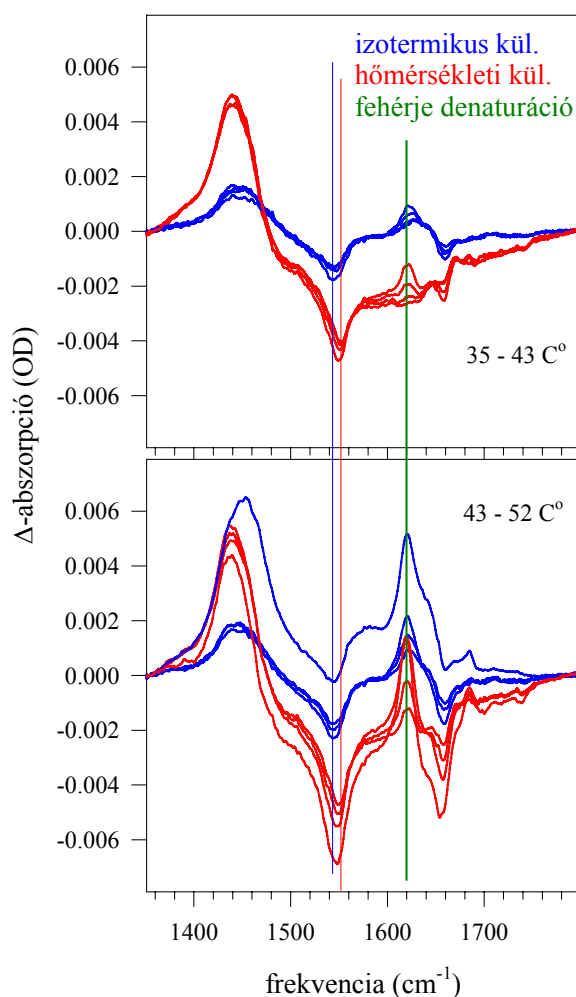
27. ábra: A H→D kicserélődés mérésének sémája. Egy adott hőmérsékleten 7 perc várakozás közbeiktatásával kétszer vettem fel az infravörös spektrumot, azután megnöveltem a hőmérsékletet 2-3 °C-kal, vártam, szintén 7 percet, és ismét felvettem két spektrumot. Ha ezek után olyan különbségi sorozatot képezek a spektrumokból, ahol mindig az előző spektrumot vonom le az utána következőből, akkor ennek a különbségi sorozatnak páratlan elemei olyan spektrumok különbségét mutatják, amelyeket azonos hőmérsékleten vettem fel, a különbség tehát az adott hőmérsékleten folyó H→D kicserélődést mutatja. A különbségi sorozat páros elemei viszont olyan spektrumok különbségét mutatják, amelyek között 2-3 °C-ot nőtt a hőmérséklet, a különbség tehát az adott hőmérsékleten a hőmérséklet-növeléssel indukálható H→D kicserélődésbeli változást mutatja⁶².

Az elgondolás lényege az, hogy egy adott hőmérsékleten kétszer megmérve az abszorpciós spektrumot, és a korábban felvettét kivonva a későbbiből, olyan különbségi spektrumot kapunk, ami jellemző az adott hőmérsékleten végbemenő H→D kicserélődésre (az így keletkező spektrumokat izotermikus különbségi spektrumoknak fogom hívni). Ha ez után felemeljük pár fokkal a hőmérsékletet, és egy olyan különbségi spektrumot képzünk, amikor az alacsonyabb hőmérsékleten felvett spektrumot kivonjuk az magasabb hőmérsékleten felvettből, (ezeket a spektrumokat hőmérsékleti különbségi spektrumoknak fogom hívni) akkor arra számíthatunk, hogy elsősorban a hőmérséklet ugrás által indukált H→D kicserélődésbeli változást látjuk.

⁶² Valójában itt a két folyamat összegéről van szó, mert a hőmérséklet ugrás alatt is folyik a „normál” H→D kicserélődés.

H→D kicserélődés dohány tilakoidban

A jobb láthatóság kedvéért ezeket a különbségi spektrumokat kisebb hőmérséklettartományokra felbontva mutatom meg. Nézzük, először, mit látunk dohány tilakoidon ([28. ábra](#)). Szembetűnő, hogy a H→D kicserélődésre jellemző



28. ábra: A H→D kicserélődés menete dohány tilakoid membránban. A felső panelben a 35-43 C° tartományban, az alsó panelben 43-52 C° között. A görbék magyarázatát lásd a [27. ábrán](#). Vegyük észre, hogy az izotermikus differencia spektrumokban az eltűnő amid II sáv frekvenciája alacsonyabb, mint a hőmérsékleti differencia spektrumokban. A függőleges egyenesek az amid II sáv eltűnésének minimumát mutatják izotermikus (kék), hőmérsékleti különbségi (piros) spektrumokra, és a fehérje denaturációra jellemző frekvenciát (zöld).

amid II sáveltűnés minimuma más-más frekvenciánál van az izotermikus és a hőmérsékleti különbségi spektrumokban.

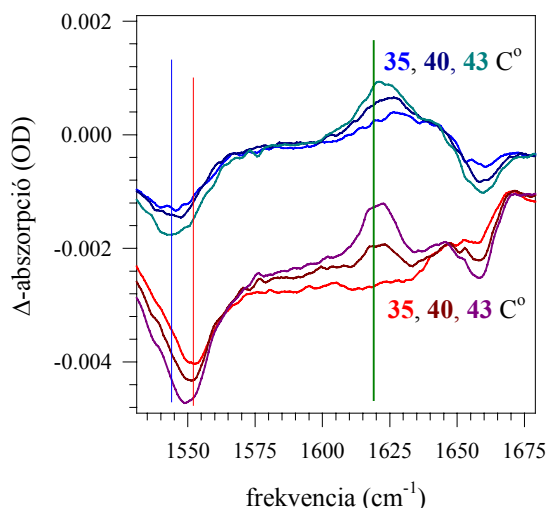
Az amid II sávnak a fehérjék másodlagos szerkezetéhez való rendelhetőségével eddig nem sokan foglalkoztak. Pedig a fehérjék másodlagos szerkezete erre a sávra is hatással van. Az irodalomban fellelhető adatok alapján azt lehet mondani, hogy a magasabb ($1545\text{-}1550\text{ cm}^{-1}$) amid II frekvencia a fehérjék α -hélix, az alacsonyabb, ($1525\text{-}1530\text{ cm}^{-1}$) frekvencia a fehérjék β -redőzött szerkezet tartalmához kapcsolható (45).

Ha megnézzük, hogy a hőmérséklet növekedésével hogyan halad előre a H $\rightarrow$ D kicserélődés, akkor azt látjuk, hogy az izotermikus különbségi spektrumokban először az α -hélixek fogyása (1656 cm^{-1} körül) figyelhető meg, ami párosul valamelyes β -redőzött szerkezet növekedéssel. Az értékelhető H $\rightarrow$ D kicserélődés $35\text{-}38\text{ }^{\circ}\text{C}$ körül indul be, ennek a tartománynak differencia spektrumait egy külön ábrán ki is nagyítottam ([29. ábra](#)).

Ha visszatérünk a denaturáció menetéhez ([28. ábra](#)), akkor azt látjuk, hogy magasabb hőmérsékleteken elkezd nőni a fehérje denaturációra jellemző $1618\text{-}1620\text{ cm}^{-1}$ körüli (inter-molekuláris β -szerkezeti) sáv is, frekvenciája kezdetben valamivel magasabb az izotermikus differencia spektrumokban, mint a hőmérsékleti differencia spektrumokban. De ennek lehet az is az oka, hogy az izotermikus differenciákban a normál β -szerkezet mennyisége látszik növekedni az α -hélix tartalom rovására, és a két sáv átfedése miatt magasabb az inter-molekuláris sáv frekvenciája.

Ahogy a hőmérséklet emelkedik, úgy lesz egyre előrehaladottabb a fehérje denaturáció is, és a hőmérsékleti különbségi spektrumokban egyre nyilvánvalóbb, hogy a fehérje denaturáció forrása az α -hélix tartalom csökkenése. Az izotermikus különbségi spektrumokban ez nem annyira egyértelmű, ott inkább csak az inter-molekuláris β -szerkezethez rendelhető csúcs intenzitása nő, de az nem világos, hogy minek a rovására. Ezzel a jelenséggel még foglalkozni kell, mert nem mérési hibáról van szó, a lentebb megtárgyalandó cianobakteriális tilakoid membránban is ugyanez a helyzet.

Mindenesetre az tisztán látszik, hogy egészen más jellegű különbségi spektrumot kapunk, ha egy adott hőmérsékleten mérünk egy kis időeltolódással, vagy ha a két mérés között ugyanannyit várva, egy kicsit megemeljük a hőmérsékletet is. Úgy tűnik, hogy a hőmérséklet emelése elsősorban az α -hélixeket érinti. Az azonos



29. ábra: Különbségi spektrumok dohány tilakoidban. Az első értékelhető különbségi spektrumok 35 C° táján jelentek meg. A kékkel induló görbék az izotermikus különbségi spektrumok, a pirossal indulók a hőmérsékletiek. A **kék egyenes** az izotermikus különbségi spektrumokra mutatja az amid II sáv maximumánál levő frekvenciát, a **piros egyenes** a hőmérsékletiekre mutatja ugyanazt. A **zöld egyenes** a fehérjék denaturációjára jellemző sáv frekvenciáját mutatja, ez a sáv teljes kifejltségében a [28. ábrán](#) látszik. A görbék részletes leírása megtalálható a [27.](#) és [28. ábra](#) aláírásában.

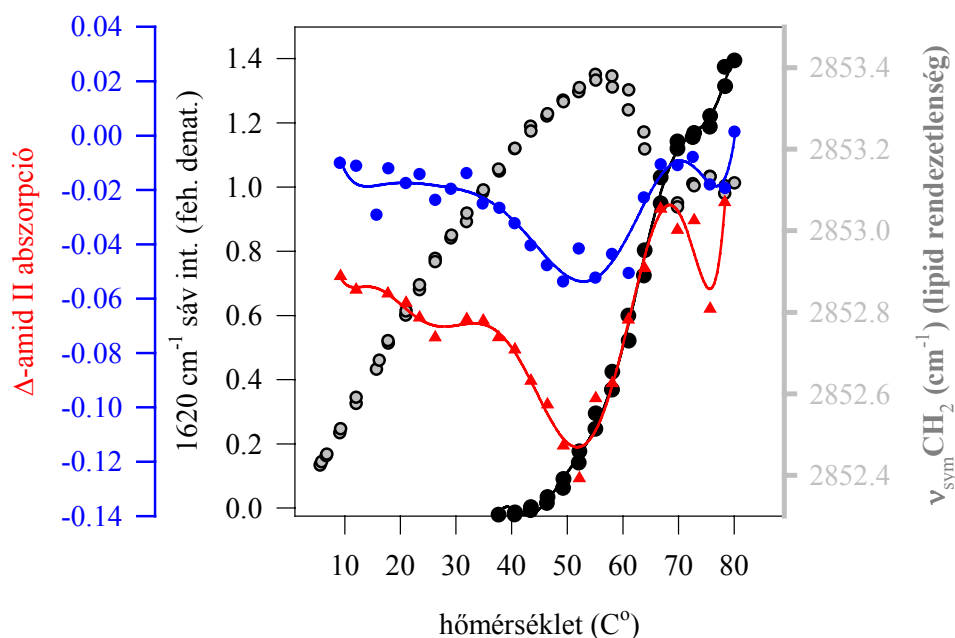
hőmérsékleti méréseknél több másodlagos szerkezet is érintett, de egyik sem olyan markánsan, mint az α -hélixek a hőmérsékleti differencia spektrumokban. És mindez megtörténik olyan hőmérsékleteken is, ahol eddigi tudásunk szerint a fehérjék szerkezete dinamikus egyensúlyban van.

A membrán szintjén az lehet a különbség az izotermikus és a hőmérsékleti differencia spektrumok körülményei között, hogy az izotermikus esetben a lipidek dinamikája azonos a két mérés során, a hőmérsékleti különbség esetében azonban a lipidek dinamikája változhat.

Ha megnézzük, hogyan változik a lipidek dinamikája és a fehérjék denaturációja a korábban bemutatott, hagyományos módon kiértékelt C-H rezgési és amid I tartomány alapján, és ezt összehasonlítjuk a H→D kicserélődés jellemző

paramétereivel (az amid II sáv intenzitás változásával, frekvenciájával), akkor a [30. ábrán](#) látható, meglehetősen komplikált, de nagyon érdekes összefüggéseket kapjuk.

Ami a membrán lipideket illeti: Rendezetlenségük már eleve nagy, amit az 5 C°-on mért 2852.5 cm⁻¹ körüli $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ frekvencia érték is mutat. A hőmérséklet növelésével a rendezetlenség tovább nő, de nem sokat, hiszen a $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ frekvencia emelkedése mindössze csak kb. 1 cm⁻¹ az 55 C° körül levő maximumig⁶³. Innen a

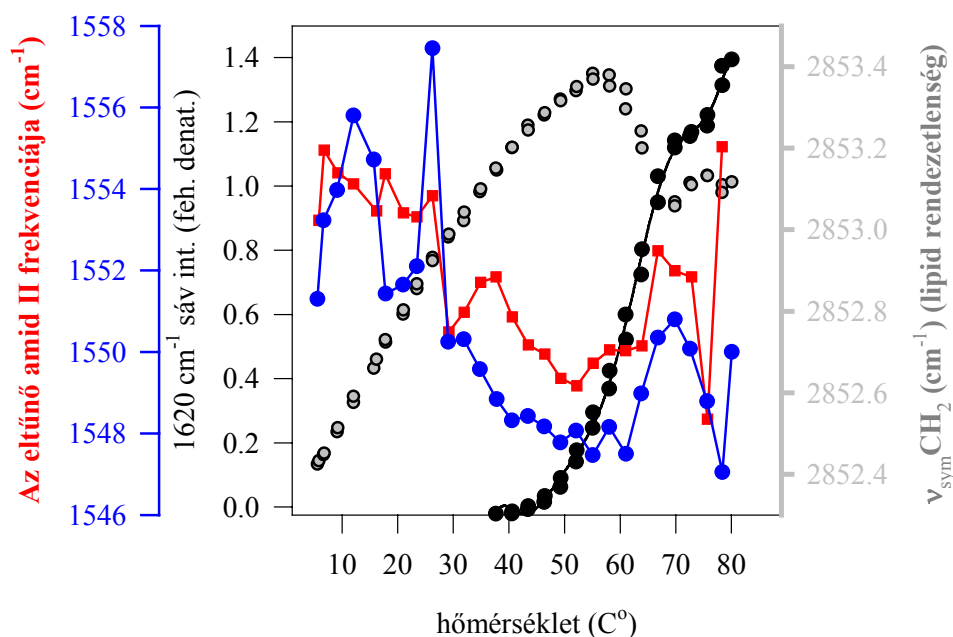


30. ábra: A membrán fehérjék denaturációjának, H→D kicserélődésének összehasonlítása a lipid rendezetlenség változásával, a hőmérséklet függvényében. A **kék pontok** az izotermikus különbségi spektrumokban mért amid II sáv intenzitás csökkenések, a **piros pontok** ugyanezek a csökkenések a hőmérsékleti differencia spektrumokban. A kék és a piros pontokhoz tartozó egyenesek nyolcadfokú polinomokkal való illesztésből származnak, és a szem vezetésén kívül nincs egyéb jelentőségük. Vegyük észre, hogy az amid II eltűnéséhez negatív ordináta tartozik, a kicserélődés lefele nő (kék tengely)! **Szürkével** jelöltem a $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ sáv frekvenciáját, **feketével** a fehérje denaturációt jellemző 1620 cm⁻¹-nél kialakuló sáv intenzitását. Ez utóbbi két adatsort az eredeti spektrumokból számoltam, nem a különbségi sorozatok spektrumaiból, így azok kétszerannyit tartalmaznak.

⁶³ Ez mutatja, hogy ellentétben a cianobakteriális tilakoidokkal, ahol megfigyelhető a 2-3 cm⁻¹ eltolódással járó gél→folyadék-kristályos átmenet, a dohány tilakoidjai eleve folyadék-kristályos állapotban vannak, a rendezetlenség ezen belül nő valamelyest.

rendezetlenség egy darabig csökken, azután ismét lassú növekedésbe kezd⁶⁴.

A fehérjét illetően: A fehérje denaturáció 38-40 °C-nál kezdődik, legmeredekebb növekedési szakasza a lipidek rendezetlenségének maximumánál kezdődik, annak csökkenésének végéig tart. Amikor a lipid rendezetlenség megint lassú növekedésnek indul, a fehérje denaturáció előrehaladása lelassul, aztán ismét



31. ábra: A membrán fehérjék denaturációjának, H→D kicserélődésének összehasonlítása a lipid rendezetlenség változásával, a hőmérséklet függvényében. A **kék pontok** az izotermikus különbségi spektrumokban mért csökkenő amid II sáv minimumának a frekvenciáját mutatják, a **piros pontok** ugyanezek a frekvenciák a hőmérsékleti differencia spektrumokban. **Szürkével** jelöltem a $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ sáv frekvenciáját, **feketével** a fehérje denaturációt jellemző 1620 cm^{-1} -nél kialakuló sáv intenzitását. Ez utóbbi két adatsort az eredeti spektrumokból számoltam, nem a különbségi sorozatok spektrumaiból.

belelendül.

Ami a H→D kicserélődés mértékét illeti: A kicserélődés mértéke mindig nagyobb a hőmérsékleti különbségek esetén, mint izotermikus különbségek között. Izotermikus körülmények között a kicserélődés növekedése 5-30 °C között elhanyagolható, a hőmérsékleti különbségi spektrumokban van valamilyes

⁶⁴ Jó egyezésben a korábban a **23. ábrán** bemutatott kétkomponenses analízissel kapott adatokkal, és okfejtéssel.

növekedés. Amikor a fehérjék denaturációja beindul (ugyanekkor van egy kis töréspont a lipid dinamika növekedésében is), akkor elkezd nőni a kicserélődés mértéke is, sokkal erősebben a hőmérsékleti különbségi esetben, mint az izotermikusban. Amikor a lipid rendezetlenség eléri maximumát, körülbelül akkor van a H→D kicserélődés maximuma is. Innen a kicserélődés mértéke csökken (együtt a lipid rendezetlenséggel, vagy a fehérje denaturáció előrehaladásával?), azután egy kisebb értéken megállapodik, ugyanabban a tartományban, ahol a lipid dinamika, és a fehérje denaturáció is megállapodott. Az amid II kicserélődési görbék szemlélésénél nem szabad elfelejtenünk a kicserélődés fentebb említett „történelmiségét”, azt hogy pl. az 50 C°-on kicserélődő H atomok egészen mások, mint amik már mondjuk 10 C°-on kicserélődtek, de persze közben azok is diffundálhatnak a fehérjékben „nehezebb” helyekre. Éppen ezért, még figyelemre méltóbb, hogy a kicserélődés adott hőmérsékleten mért sebessége ilyen jó egyezést mutatott az egyéb membránalkotók változásával.

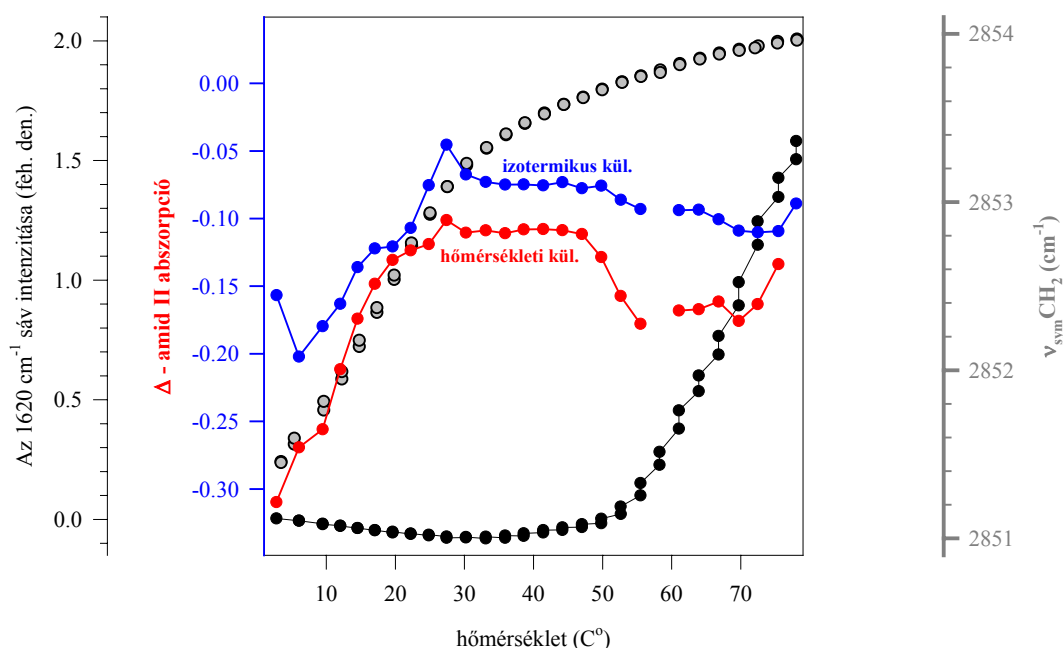
Eddig a kicserélődés mértékét vizsgáltuk, de van a különbségi spektrumokban olyan információ is, nevezetesen az eltűnő amid II sáv minimumának frekvenciája, amiből az is kiderülhet, hogy a membrán fehérjék mely részei érintettek a H→D kicserélődésben. Ezt mutatja a [31. ábra](#).

Körülbelül 30 C°-tól kezdve, ahol az amid II sáv fogyása kezd jelentősebbé válni, lehetett biztonságosabban meghatározni a csökkenő sáv minimumának frekvenciáját. Ez a frekvencia mindig 2-3 hullámszámmal alacsonyabb volt az izotermikus különbségi spektrumokban, mint a hőmérsékletiekben, ami arra utal, hogy a hőmérsékletiekben valamivel inkább α-szerkezetek voltak érintve a kicserélődésben, mint az izotermikusokban.

H→D kicserélődés cianobakteriális tilakoidban

Mint azt a [14. ábra](#) mutatja, a dohány és a cianobakteriális tilakoid membrán igen eltér egymástól. A cianobaktériumok lipid összetétele sokkal egyszerűbb,

tilakoid membránjaik fehérje/lipid aránya sokkal alacsonyabb⁶⁵, mint a magasabb rendű növények tilakoidjáé. Ennek megfelelően, a cianobaktériális tilakoidban, a magasabb rendű növényéhez képest, különbségekre számíthatunk a fehérje-lipid



32. ábra: A membrán fehérjék denaturációjának, H→D kicserélődésének összehasonlítása a lipid rendezetlenség változásával, a hőmérséklet függvényében *Synechococcus* PCC7942 tilakoid membránban. A **kék pontok** az izotermikus különbségi spektrumokban mért eltűnő amid II sáv intenzitás változását mutatják, a **piros pontok** ugyanezek az intenzitás változások a hőmérsékleti differencia spektrumokban. **Szürkével** jelöltem a $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ sáv frekvenciáját, **feketével** a fehérje denaturációt jellemző 1620 cm^{-1} -nél kialakuló sáv intenzitását. Ez utóbbi két adatsort az eredeti spektrumokból számoltam, nem a különbségi sorozatok spektrumaiból. Vegyük észre, hogy a Δ -amid II abszorpció skálája negatív, mert a sáv eltűnését méri, így minél lejjebb vannak a görbe pontjai, annál nagyobb a kicserélődés!

kölcsönhatásban, a membrán dinamikában is.

A H→D kicserélődés menetét, *Synechococcus* PCC7942 (*Anacystis nidulans* R2) tilakoid membránban, összehasonlítva a lipid dinamika és a fehérje denaturáció hőmérsékletfüggésével a [32. ábra](#) mutatja be. (Az izotermikus és hőmérsékleti

⁶⁵ A fehérje/lipid aránybeli eltérés főleg a fénybegyűjtő antennák különbözősége miatt van. A cianobaktériumokban a fehérjékből (fikobiliproteinek) álló antennák legnagyobb része a tilakoid membrán felszínéhez tapadt fikobiliszómákban helyezkedik el, mely fikobiliszómák a tilakoid membrán tisztítása során lemosódnak. A magasabb rendű növényekben az egész antenna rendszer a tilakoid membránban van, és klorofill-fehérje komplexekből áll, a tilakoid membrán tisztítása során bennmarad a membránban.

különbségi spektrumok hasonlóak voltak a dohányban tapasztaltakhoz, csak más hőmérsékleteken jelentkeztek a változások, így azokat itt újra nem mutatom be.)

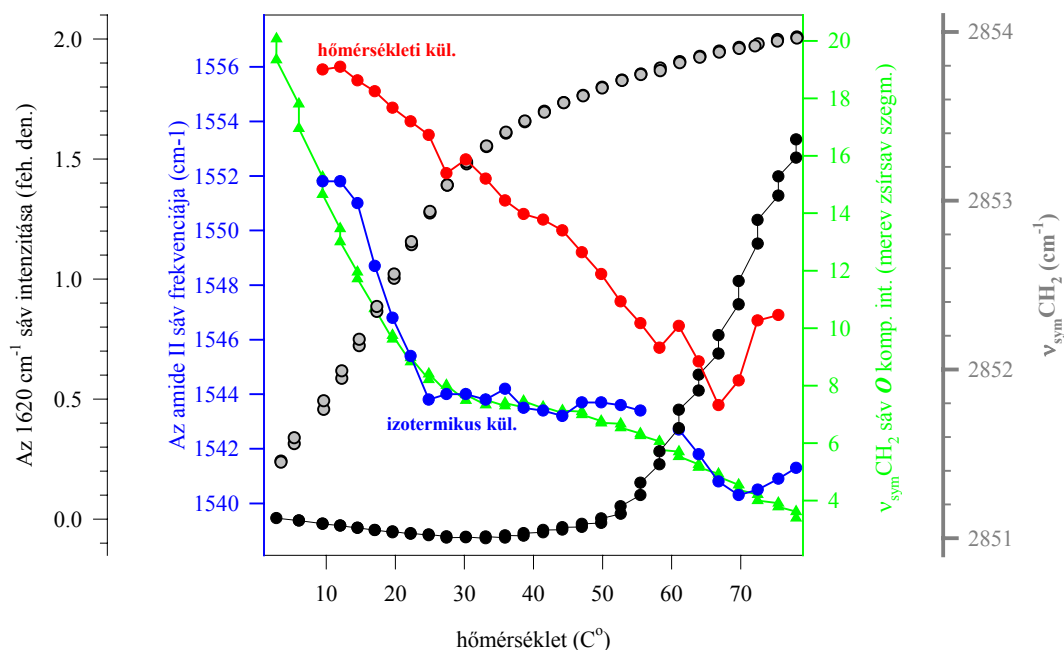
Az ábrán nagyon világosan látszik, hogy kezdetben, amikor a membrán lipidjei még gél fázisban vannak, akkor a H→D kicserélődés nagymértékű, amint véget ér a gél→folyadékkristályos fázisátmenet, a H→D kicserélődés egy alacsonyabb szinten stabilizálódik, és stabil marad egészen addig, amíg meg nem indul a fehérjék denaturációja, amikor, inkább csak a hőmérsékleti különbségi spektrumokban, újra elkezd nőni a H→D kicserélődés sebessége.

Azt közvetítőleg meg szeretném jegyezni, hogy ellentétben a dohány tilakoid membránnal, itt, a *Synechococcus* membránban, a lipidek nem „veszik észre”, hogy a fehérjék denaturálódnak. Emlékeztünk rá, hogy a dohány tilakoidban ([30. ábra](#)) szoros összefüggés volt a lipidek rendezetlensége és a fehérjék denaturációja között.

Az eredmény úgy értelmezhető, hogy amíg a lipidek dinamikája nem megfelelő (gél fázis), addig nem megfelelő a lipid-fehérje kölcsönhatás sem, ezért a külvilág jobban hozzá tud férni a membránfehérjékhez, gyorsabb a H→D kicserélődés, annak ellenére, hogy a hőmérséklet alacsony, mint később, amikor a megfelelő dinamikájú (folyadékkristályos) lipidek megfelelően „zárnak” a fehérjékhez.

Ezt azért nem láttuk így a dohány tilakoidban, mert ott a lipidek már alacsony hőmérsékleten is folyadékkristályos állapotban vannak, ennek megfelelően a dohányban, a fehérje denaturáció kezdetéig, alig változott a H→D kicserélődés sebessége ([30. ábra](#)), összhangban az itteni eredménnyel, ahol szintén állandó volt a H→D kicserélődés a folyadékkristályos fázis kialakulásától a fehérje denaturáció kezdetéig ([32. ábra](#)).

Ha megnézzük, hogy a *Synechococcus* PCC7942 cianobaktériumban hogyan változott az eltűnő amid II sáv minimum frekvenciája ([33. ábra](#)), akkor az látjuk, hogy az izotermikus különbségi spektrumokban az eltűnő amid II sáv minimumának frekvenciája úgy tolódik alacsonyabb értékek felé, ahogy a lipid fázis gél→folyadékkristályos átmenete halad. Ezt még hangsúlyosabban bemutatandó, a [33. ábrán](#) feltüntettem a $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ sáv rendezett zsírsav szegmenseknek megfeleltetett *O* komponensének a növekvő hőmérséklet függvényében való eltűnését is. Ezek



33. ábra: A membrán fehérjék denaturációjának, H→D kicserélődésének összehasonlítása a lipid rendezetlenség változásával, a hőmérséklet függvényében. A **kék pontok** az izotermikus különbségi spektrumokban mért eltűnő amid II sáv maximumának frekvenciáját mutatják, a **piros pontok** ugyanezek a frekvenciák a hőmérsékleti differencia spektrumokban. **Zölddel** jelöltem a $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ sáv korábban bemutatott, a zsírsavláncok rendezett szegmenseit reprezentáló **O** komponensének intenzitását. **Szürkével** jelöltem a $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ sáv frekvenciáját, **feketével** a fehérje denaturációt jellemző 1620 cm^{-1} -nél kialakuló sáv intenzitását. Ez utóbbi három adatsort az eredeti spektrumokból számoltam, nem a különbségi sorozatok spektrumaiból.

szerint az izotermikus körülmények között folyó H→D kicserélődés tökéletesen érzékeli a fehérje körül levő lipid fázis állapotát. De mit jelent az amid II minimum frekvenciájának eltolódása? Ha az irodalmi adatokra gondolunk (45), akkor a magas frekvencia α -hélixeket, az alacsony frekvencia β -redőzött szerkezeteket jelent. Feltehető, hogy a kétféle szerkezetet különböző arányban érinti a kicserélődés különböző hőmérsékleteken.

Hőmérsékleti különbségi spektrumokban a kép még rejtélyesebb, mert az eltűnő amid II sáv minimum frekvenciája szinte lineárisan csökken hőmérséklet növekedésével (33. ábra). A frekvencia némi növekedésnek csak a fehérje denaturációval párhuzamosan indul. Ezeknek a szisztematikusan visszatérő kísérleti adatoknak a megfelelő megértéséhez még további, valószínűleg más időzítésű mérésekre lesz szükség, és minden bizonnyal a különbségi spektrumok kiértékelését is finomítanunk kell.

Összefoglalva, az eredményekből az biztonsággal következtethető, méghozzá általánosságban, mert ugyanazt tapasztaltuk egy magasabb rendű növényben és egy cianobaktériumban is, hogy a lipidek rendezetlenségének mértéke nagy hatással van a membránfehérjék H→D kicserélődésére. A fiziológiai hőmérséklet tartományban a membránok dinamikája gyakorlatilag nem változik, még akkor sem, ha ez a hőmérséklettartomány meglehetősen széles, amit a legjobban az mutat, hogy a H→D kicserélődés sebessége itt állandó, és mérsékelt. Ha a membrán szerkezete megbomlik, akár alacsony hőmérsékleten, mert a lipidek gél fázisba mennek át, akár magas hőmérsékleten, mert a fehérjék denaturálódnak, akkor a H→D kicserélődés sebessége megnő.

ÖSSZEFOGLALÁS

A dolgozatban a membrándinamika problémakörét jártam körül, abból a speciális nézőpontból, amit a Fourier transzformációs infravörös (FTIR) spektroszkópia tesz lehetővé. Az FTIR spektroszkópia technikai lehetőségeit kihasználva gyűjtöttem információt a lipidek, a fehérjék viselkedéséről a membránokban, és arról, ami a membránt membránná teszi, a lipidek és a fehérjék kölcsönhatásáról.

Ennek a célnak érdekében magát a technikát is fejleszteni kellett, így kidolgoztam, hogy hogyan lehet az eddiginél nagyobb érzékenységgel meghatározni a lipidek zsírsavláncainak állapotát a membránban. A korábban ugyancsak általunk bevezetett eljárást, hogy a zsírsavak fázisviszonyaira érzékeny $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ sáv frekvenciáját a sáv maximumának környezetében illesztett polinom helyett, az egész sávhoz illesztett Lorentz görbe középfrekvenciájából határozzuk meg, tovább fejlesztettük. Megmutattuk, hogy a $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ sávnak a gél→folyadékkristályos átmenet során magasabb frekvenciák felé való eltolódása annak a következménye, hogy megváltozik a sávhoz hozzájáruló, legalább kétféle populáció eloszlása. Megmutattuk, hogy az egyik, homogénnek feltételezett populáció a zsírsavláncok rendezett szegmenseihez, a másik a rendezetlen szegmensekhez tartozik, és arányuk megváltozása áll a $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ sáv hőmérséklet függő eltolódása mögött. Ezzel a felismeréssel sikerült egy, az irodalomban meglevő ellentmondást is feloldani, az eltolódás során mért sáv szélesség- és frekvencia-változás hőmérsékletfüggése között.

Egy másik technikai fejlesztésünk egy olyan eljárás kidolgozása volt, aminek segítségével biztonsággal meg lehet állapítani nagyon kicsi fehérje abszorpció esetében is, hogy a fehérje amid I sávjában hány komponens van. Ez megoldást kínált az irodalomban széles körben elterjedt műtermékek kiküszöbölésére. Azt javasoltuk, hogy a vízgőz zavaró jelének levonása után, mielőtt a második deriváltból, vagy Fourier ön-dekonvolúcióból meghatároznánk a lehetséges amid I komponensek számát, frekvenciáját (ezek azok az adatok, amik a rendszerint szükségszerűen tökéletlen vízgőz spektrum levonás miatt általában hamisak voltak korábban), végezzünk Fourier simítást, aminek pontos feltételeit is megadtuk. Ez

után, a simított spektrum második deriváltjából határozzuk meg az amid I sáv komponenseinek a későbbi illesztéshez szolgáló induló paramétereit.

A biológiai problémák vizsgálatánál olyan rendszereket választottam, amelyek jól meghatározottak, genetikájuk ismert, és lehetőség van molekuláris biológiai módszerekkel befolyásolni azokat és csak azokat a membránösszetevőket, amelyekre kíváncsiak voltunk.

Az első problémakör, amivel foglalkoztam, a fotoszintetikus szervezetek hőmérséklet adaptációjának kérdése volt, ehhez egy cianobaktériumot, és egy magasabb rendű növényt, a dohányt választottam. Az alkalmazkodás tényezőiként megvizsgáltam a lipidek telítetlenségének szerepét (mutáns cianobaktériumok felhasználásával), egy speciális szerepű lipid, a foszfatidil-glicerol (PG) szerepét dohányban (transzgenikus növények felhasználásával). Megvizsgáltam a fény szerepét a hőmérséklet adaptációban. Mivel a lipidek szerepének vizsgálatánál észrevettük, hogy a karotinoid tartalom is megváltozik a hőmérséklet adaptáció során, vizsgálatainkat kiterjesztettük a karotinoidok esetleges membránszerkezeti szerepének vizsgálatára is.

Megállapítottam, hogy a lipidek telítetlenségének megváltoztatása nagyon fontos a *Synechocystis* PCC6803 baktérium hőmérséklet adaptációjában. A sejt, kifinomult deszaturáz enzimrendszere segítségével úgy állítja be a membrán lipidek zsírsavláncainak dinamikáját, hogy az a fiziológiás tartományon belüli hőmérsékleteken azonos legyen. Ha a deszaturáció lehetőségét mutációval elveszjük a sejtektől, akkor alacsony hőmérsékleten a membrándinamika annyira lecsökken, hogy bár a sejtek nehézségek árán képesek életben maradni, de nem tudnak megfelelően reagálni semmilyen „extra” stresszre, például az alacsony hőmérsékleti fotoinhibícióra. Magas hőmérsékleteken a zsírsavak telítetlensége nem mutatkozott jelentős szabályozó faktornak az adaptációban.

Magasabb rendű növényekben a lipidek sokkal telítetlenebbek, ezért membrán szinten nem lehetett kimutatni a hőmérséklet adaptációt. De van a membránokban egy olyan lipid, a foszfatidil-glicerol (PG), aminek zsírsavjaiban a cis-telítetlen zsírsavak aránya együtt nő a növények hidegtűrésével, ami azért különösen érdekes, mert a PG a magasabb rendű növények tilakoid membrán lipidjeinek mindössze kb.

10%-át teszi ki. Az, hogy ilyen kis mennyiségben jelen levő lipid mutatotta ezt az összefüggést, arra utalhat, hogy ennek a lipidnek valamilyen módon kitüntetett szerepe lehet a növények hidegtűrésében.

Vad típusú és genetikailag módosított dohányban vizsgáltuk a PG szerkezeti szerepét a hőmérséklet adaptációban. Olyan transzgenikus dohányokat vizsgáltunk, amelyekbe a hidegre érzékenyebb tök glicerol-foszfát acil transzferáz (GPAT) enzimjének génjét, illetve a hidegtűrőbb Arabidopsis GPAT génjét építették be. Ennek következtében a transzgenikus dohányokban a PG zsírsavösszetétele telítettebb, illetve telítetlenebb lett, mint a vad típusú dohányban volt. Vizsgálataink kimutatták, hogy a tök típusú GPAT enzim olyan PG populációt hoz létre a dohány tilakoidban, amelyik merevíti a membránokat, és ez a merevítő hatás 25 °C alatti hőmérsékleten válik jelentőssé. A rendezetlenebb Arabidopsis eredetű GPAT-nak nem volt ilyen hatása, csak kis mértékben még rendezetlenebbé tette a dohány tilakoid membránt. A jelenség szerkezeti magyarázatot adott arra, hogy a tök GPAT-val transzformált dohány miért volt érzékenyebb az alacsony hőmérsékleti fotoinhibícióra, mint a vad típusú dohány. A magyarázat szerint a fotoszintézis során folyamatosan károsodó, és a sejt által folyamatosan újakkal pótolta D1 molekulák tilakoid membránbeli elhelyezése, működésének optimalizálása válik sokkal nehezebbé a telítettebb zsírsavláncokat tartalmazó membránokban a 25 °C alatti hőmérsékleteken. A D1 fehérje (a fotoszintetikus fehérje komplex egyik eleme) processzálásának nehézségei több hőmérséklet adaptációs vizsgálatban is a bajok eredetének bizonyultak.

Ami tehát a lipidek telítetlenségének szerepét illeti a hőmérséklet adaptációban, az elsősorban az alacsony hőmérsékleteknél fontos, és ebben az adaptációban a kis mennyiségben, de „érzékeny” helyeken jelen levő lipideknek is számottevő szerepe lehet. A kérdést azonban nem lehet ilyen egyszerűen lezárni, mert van pl. olyan cianobaktérium, mint a *Synechococcus* PCC7942, amelynek fiziológiás hőmérséklettartománya pár fokkal el van ugyan tolódva felfelé a kifinomult deszaturáz rendszerrel rendelkező, háromszorosan, négyszeresen telítetlen zsírsavakat is tartalmazó *Synechocystis* PCC6803 cianobaktériuméhoz képest, de csak telített és egyszeresen telítetlen zsírsavakkal rendelkezik. Ebben az esetben tehát másmilyen szabályozásnak is kell lennie a sejtekben.

Az egyik további lehetőség a karotinoidok, az általánosan fényvédő pigmenteknek ismert molekulák szerkezeti védő szerepe. Megmutattuk, hogy egy olyan szervezetben, ahol egyébként működik a zsírsavak kívánt telítetlenségét beállító deszaturáz enzimrendszer, elsősorban alacsony hőmérsékleteken, átalakul a sejtek karotin tartalma, felnő a poláros mixoxantofillok mennyisége, és ezzel párhuzamosan egy igen merev zsírsavlánc populációra utaló komponens jelenik meg a $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ sávban, mint azt a sáv általunk kifejlesztett két-komponenses illesztésével megmutattuk. Az eredmény egy, a lipidek deszaturációjának révén fenntartott állandó membrán dinamikán alapuló „logikától” eltérő védekezési mechanizmus jelenlétére utalhat. A sejteknek lehet, hogy jobban megéri merev doménekkel „elállni” a fotoszintetikus apparátus egyes elemeire veszélyes szabad gyökök útját, mint az energia szempontjából „ínséges” alacsony hőmérsékleteken lefolytatni a fotoszintetikus apparátus egyébként állandó javítását.

Megvizsgáltuk a fotoszintetizáló szervezetek életére a legnagyobb befolyást gyakorló faktor, a fény hatását is. A *Synechocystis* PCC6803 fiziológiai hőmérséklet tartományának alsó és felső határának közelében (25 és 35 °C) neveltünk sejteket autotróf és fény-indukált heterotróf módon. Kiderült, hogy csak a fényen nevelt sejtek voltak képesek fotoszintetikus aktivitásuk maximumát a nevelési hőmérséklethez igazítani. A sötétben nevelt sejtekben a deszaturáz rendszernek csak egyes elemei működtek, így membránjaikból hiányoztak a többszörösen telítetlen zsírsavak, amik ezek szerint feltétlenül szükségesek a fotoszintetikus apparátus optimális működéséhez, mert egyébként, a membránoknak a $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ sáv frekvenciája alapján mért dinamikája megfelelő volt. Azaz, a fenti következtetést a lipidek telítetlenségének az alacsony hőmérsékleti adaptációban játszott szerepéről kiegészíthetjük azzal, hogy a többszörösen telítetlen zsírsavakra az őket tartalmazó szervezetekben nemcsak a megfelelő membrándinamika fenntartásához, hanem a megfelelő fehérje-lipid kölcsön-hatásokhoz is szükség van.

A membrándinamikát a lipid-fehérje kölcsönhatásokon keresztül tanulmányoztam. Észrevettem ugyanis, hogy egyidejű változásokat lehet megfigyelni az infravörös spektrum csak lipidekre, illetve csak fehérjékre jellemző régióiban. Ahogy a hőmérsékletet növeljük, összefüggést láthatunk a $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ sáv két-komponenses illesztésében használt, a rendezett zsírsavlánc szegmensekre jellemző

O komponens eltűnése, és a fehérjék másodlagos szerkezetének változékonysága között. Az **O** komponens jó részének el kell tűnnie (azaz a folyadékkristályos állapotnak ki kell alakulnia ahhoz, hogy a fehérjék mozoghassanak a membránban. Ez a mozgás még nem jár a fehérjék denaturációjával, mert a denaturációra jellemző 1620 cm^{-1} táján levő sáv csak magasabb hőmérsékleteken jelenik meg. Amikor a denaturáció beindul, változás áll be a szintén a lipidekre jellemző 1741 cm^{-1} körül levő sáv frekvenciájában is. Ez az észter kötés $\text{C}=\text{O}$ rezgéséből származik, és ellentétben a $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ sávval, ami az egész zsírsavlánc átlagát mutatja, a membrán felszínének közeléből tudósít. Az 1741 cm^{-1} -es sáv nem mutat változást a fehérjemozgások beindulásakor, de jelzi a fehérje denaturáció beindulását. Ebből arra következtethetünk, hogy a fehérjék szerkezetváltozása, és később denaturációja is a membrán hidrofób régiójában indul, és onnan terjed ki a membrán felszínei felé.

A fehérje-lipid kölcsönhatás egész folyamatát, és a membrándinamika hőmérsékletfüggését is nyomon követhetjük a $\text{H}\rightarrow\text{D}$ kicserélődés vizsgálatával. Megközelítésünk egészen új, nem tudok az irodalomban olyan cikket, ami a fehérjéknek a lipidek által szabályozott $\text{H}\rightarrow\text{D}$ kicserélődésével foglalkozna. Vizsgálataink kimutatták, hogy a membrán lipidek gél állapotában rossz a csatolás fehérjék és a lipidek között, ezért a $\text{H}\rightarrow\text{D}$ kicserélődés gyors, a sejtek fiziológiai hőmérséklet tartományában a $\text{H}\rightarrow\text{D}$ kicserélődés sebessége alacsony, és gyakorlatilag nem változik a hőmérséklettel. Azaz, a sejtek egy elég széles hőmérséklet tartományban tudnak majdnem változatlan membrándinamikát fenntartani.

A fiziológiai feletti hőmérséklet tartományban két teljesen eltérő viselkedést találtunk a cianobakteriális illetve a magasabb rendű tilakoid membránokban: Az alacsonyabb fehérje/lipid aránnyal rendelkező cianobakteriális membránban a lipidek nem veszik észre a fehérjék denaturációját, de a $\text{H}\rightarrow\text{D}$ kicserélődés valamelyest érzékeny erre, mértéke a fehérje denaturáció kezdetén megnő. Magasabb rendű növényekben a lipidek érzékenyen reagálnak a fehérjék változására, a lipid rendezetlenség a denaturáció hatására átmenetileg lecsökken. Nagyon érzékeny a fehérjék viselkedésére a $\text{H}\rightarrow\text{D}$ kicserélődés is, a fehérje denaturáció kezdetén sebessége megnő, a denaturáció kiteljesedésekor erősen lecsökken.

A dolgozatban végig szem előtt tartottam annak vizsgálatát, hogy melyik összetevő, a lipidek, vagy a fehérjék felelősek inkább a membrándinamika fenntartásáért, szabályozásáért. A különböző kísérletek különböző erősségű válaszokat adtak e tekintetben. Ha összetesszük valamennyi eredményt, akkor az alábbi konklúzióra juthatunk:

Alacsony hőmérsékleteken egészen biztosan a lipidek a meghatározóak. Az olyan membránokban, amelyeknek nulla fok felett van a gél→folyadékkristályos fázisátmenete, egyértelműen látszott, hogy az egyes fehérjék működőképessége, a fehérjék optimális szerkezetének kialakítása, a fehérjeszerkezet motilitásának megjelenése, mind a folyadékkristályos fázis kialakulásához köthetőek.

A fiziológiai hőmérséklet tartományban, ahol a szervezetek élnek, a H→D kicserélődés tanúsága szerint meglehetősen állandó a membrándinamika, a dinamikus egyensúly fennáll tulajdonképpen egészen addig, amíg meg nem indul a fehérjék denaturációja. Ez a tartomány akár 20-25 C°-ot is átfoghat. A dinamikus egyensúly tartományában nem tudjuk megmondani, hogy a fehérjék, vagy a lipidek tulajdonságai számítanak-e inkább a membrándinamika fenntartásában. Ennek eldöntéséhez ki kell billenteni az egyensúlyából a rendszert. Ez történik, ha a fiziológiai tartomány fölötti hőmérsékletekre tesszük a membránokat.

A magas hőmérséklet tartományban (40-80 C°), a vizsgált kétféle cianobaktériumban, amiknek fiziológiás hőmérséklettartománya 37-39 C°-ig terjed, és fotoszintetikus aktivitásukat 42-43 C°-nál kezdik elveszteni, nem látunk változást a lipid rendezetlenségben az 50-55 C°-nál induló fehérje denaturációval (ami az egész vizsgált hőmérséklet tartományban csak részleges kitekérést jelentett) párhuzamosan. Ebből arra következtethetnénk, hogy cianobaktériumokban magas hőmérsékleten a fehérjék dinamikája határozza meg, mi történik a membránban.

A magas hőmérséklettartományban, a magasabbrendű növényekből példának vett dohány esetében, a lipid fázis átlagos rendezetlensége azonnal csökkenni kezd, amint a fehérje denaturáció 40-45 C° körül beindul. (Ez a denaturáció is szintén csak részleges az egész vizsgált hőmérséklet tartományban.) Ezzel szemben, az igen hasonló felépítésű fotoszintetikus apparátussal rendelkező cianobaktériumokban a fotoszintetikus aktivitás elvesztése fölött kb. 10 C°-kal magasabb hőmérsékleten

kezdődött csak el a fehérje denaturáció. A magasabbrendű növények tilakoidjában sokkal magasabb a fehérje/lipid arány és a zsírsavak telítettségének szintje, mint a cianobakteriális tilakoidban. Lehet, hogy ezek a nagyon telítetlen lipidek ezen a hőmérsékleten át tudnak menni egy másik (esetleg nem kettősréteget kialakító) lipid fázisba, ezért a fehérjék körül felborul az addig dinamikus egyensúlyban levő membrán szerkezet, és megindul a fehérjék denaturációja (ennek a lehetőségnek ellentmondani látszik az, hogy ebben az esetben a lipid rendezetlenség növekedésére számítanánk, mi viszont annak éppen a csökkenését tapasztaltuk). A másik lehetőség az, hogy a fehérjék szerkezete saját belső viszonyaik miatt omlik össze, és a hődenaturációval járó aggregációjuk szorítja ki a lipideket a fehérje-lipid határfelületekről a membrán lipid fázisába, ahol rendezettebben tudnak elhelyezkedni, mint a fehérje-lipid határfelületen. Ezért úgy gondolom, hogy a magasabbrendű növényeken eddig végzett a kísérleteink bár gyengébben, de szintén a fehérjék kulcsszerepére utalnak a magas hőmérsékleti membrán dinamikában.

A hőmérsékleti stressz és a sejtválasz kapcsolatát egy mondatban összegezve, az nyilvánvaló, hogy alacsony hőmérsékleti stressz esetében a membrán lipidek dinamikájának van döntő befolyása a sejtválasz beindításában, magas hőmérsékleti stressz esetében a helyzet még nem ennyire világos, de inkább a fehérjék között kell keresni azt a komponenst, amelyik ebben a hőmérséklet tartományban gyorsan változó szerkezettel, esetleg egy speciális fehérje korai denaturációjával adhatja meg a jelet a sejtnak válaszreakciója beindítására.

A DOLGOZATBAN FELHASZNÁLT SAJÁT KÖZLEMÉNYEK

- S1.** Kota, Z., Debreczeny, M., and **Szalontai, B.** Separable contributions of ordered and disordered lipid fatty acyl chain segments to nu CH₂ bands in model and biological membranes: A fourier transform infrared spectroscopic study (1999) *Biospectroscopy* 5, 169-178.
- S2.** Schwinte, P., Voegel, J. C., Picart, C., Haikel, Y., Schaaf, P., and **Szalontai, B.** Stabilizing effects of various polyelectrolyte multilayer films on the structure of adsorbed/embedded fibrinogen molecules: An ATR-FTIR study (2001) *Journal of Physical Chemistry B* 105, 11906-11916.
- S3.** **Szalontai, B.**, Nishiyama, Y., Gombos, Z., and Murata, N. Membrane dynamics as seen by Fourier transform infrared spectroscopy in a cyanobacterium, *Synechocystis* PCC 6803 - The effects of lipid unsaturation and the protein-to-lipid ratio (2000) *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes* 1509, 409-419.
- S4.** Inaba, M., Suzuki, I., **Szalontai, B.**, Kanesaki, Y., Los, D. A., Hayashi, H., and Murata, N. *Gene-engineered rigidification of membrane lipids enhances the cold inducibility of gene expression in Synechocystis* (2003) *Journal of Biological Chemistry* 278, 12191-12198.
- S5.** **Szalontai, B.**, Kota, Z., Nonaka, H., and Murata, N. Structural consequences of genetically engineered saturation of the fatty acids of phosphatidylglycerol in tobacco thylakoid membranes. An FTIR study (2003) *Biochemistry* 42, 4292-4299.
- S6.** Zsiros, O., Kis, M., Mustardy, S., Farkas, T., Varkonyi, Z., Gombos, Z., and **Szalontai, B.** *Light-driven structural changes in thylakoid and cytoplasmic membranes of a cyanobacterium, Synechocystis PCC 6803* (2002) *Journal of Plant Physiology* 159, 403-414.
- S7.** Varkonyi, Z., Masamoto, K., Debreczeny, M., Zsiros, O., Ughy, B., Gombos, Z., Domonkos, I., Farkas, T., Wada, H., and **Szalontai, B.** *Low-temperature-induced accumulation of xanthophylls and its structural consequences in the photosynthetic membranes of the cyanobacterium Cylandrospermopsis raciborskii: An FTIR spectroscopic study* (2002) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 2410-2415.
- S8.** **Szalontai, B.**, Horvath, L. I., Debreczeny, M., Droppa, M., and Horvath, G. Molecular rearrangements of thylakoids after heavy metal poisoning, as seen by Fourier transform infrared (FTIR) and electron spin resonance (ESR) spectroscopy (1999) *Photosynthesis Research* 61, 241-252.

HIVATKOZÁS JEGYZÉK

Reference List

1. Singer, S. J. and Nicolson, G. L. (1972) *Science* **175**, 720-731
2. Vereb, G., Szollosi, J., Matko, J., Nagy, P., Farkas, T., Vigh, L., Matyus, L., Waldmann, T. A., and Damjanovich, S. (2003) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **100**, 8053-8058
3. Simons, K. and Ikonen, E. (1997) *Nature* **387**, 569-572
4. Gaber, B. P. and Peticolas, W. L. (1977) *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes* **465**, 260-274
5. Szalontai, B. (1976) *Biochemical and Biophysical Research Communications* **70**, 947-950
6. Mantsch, H. H. and McElhaney, R. N. (1991) *Chem.Phys.Lipids* **57**, 213-226
7. Moore, D. J. and Mendelsohn, R. (1994) *Biochemistry* **33**, 4080-4085
8. Moore, D. J., Sills, R. H., and Mendelsohn, R. (1995) *Biospectroscopy* **1**, 133-140
9. Moore, D. J., Sills, R. H., Patel, N., and Mendelsohn, R. (1996) *Biochemistry* **35**, 229-235
10. Szalontai, B., Vigh, L., Joo, F., Senak, L., and Mendelsohn, R. (1994) *Biochemical and Biophysical Research Communications* **200**, 246-252
11. Chia, N. C. and Mendelsohn, R. (1992) *Journal of Physical Chemistry* **96**, 10543-10547
12. Senak, L., Moore, D., and Mendelsohn, R. (1992) *Journal of Physical Chemistry* **96**, 2749-2754
13. Casal, H. L. and Mantsch, H. H. (1984) *Biochim.Biophys.Acta* **779**, 381-401
14. Mantsch, H. H. and McElhaney, R. N. (1991) *Chem.Phys.Lipids* **57**, 213-226
15. Mantsch, H. H. and McElhaney, R. N. (1991) *Chem.Phys.Lipids* **57**, 213-226
16. Cameron, D. G., Kauppinen, J. K., Moffatt, D. J., and Mantsch, H. H. (1982) *Applied Spectroscopy* **36**, 245-250

17. Casal, H. L. and Mantsch, H. H. (1984) *Biochim.Biophys.Acta* **779**, 381-401
18. Casal, H. L., Cameron, D. G., Smith, I. C., and Mantsch, H. H. (1980) *Biochemistry* **19**, 444-451
19. Casal, H. L., Cameron, D. G., Jarrell, H. C., Smith, I. C. P., and Mantsch, H. H. (1982) *Chemistry and Physics of Lipids* **30**, 17-26
20. Dluhy, R. A., Mendelsohn, R., Casal, H. L., and Mantsch, H. H. (1983) *Biochemistry* **22**, 1170-1177
21. Casal, H. L., Cameron, D. G., Smith, I. C., and Mantsch, H. H. (1980) *Biochemistry* **19**, 444-451
22. Dluhy, R. A., Moffatt, D., Cameron, D. G., Mendelsohn, R., and Mantsch, H. H. (1985) *Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne de Chimie* **63**, 1925-1933
23. Mendelsohn, R. and Davies, M. A. (1991) *Acs Symposium Series* **447**, 24-43
24. Senak, L. and Mendelsohn, R. (1993) *Biochemistry* **32**, 6288-6294
25. PastranaRios, B., Flach, C. R., Brauner, J. W., Mautone, A. J., and Mendelsohn, R. (1994) *Biochemistry* **33**, 5121-5127
26. Gericke, A. and Mendelsohn, R. (1996) *Langmuir* **12**, 758-762
27. Gericke, A., Moore, D. J., Erukulla, R. K., Bittman, R., and Mendelsohn, R. (1996) *Journal of Molecular Structure* **379**, 227-239
28. Moore, D. J., Sills, R. H., and Mendelsohn, R. (1997) *Biochemistry* **36**, 660-664
29. Joo, F., Balogh, N., Horvath, L. I., Filep, G., Horvath, I., and Vigh, L. (1991) *Analytical Biochemistry* **194**, 34-40
30. Szalontai, B., Joo, F., Papp, E., and Vigh, L. (1995) *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications* 2299-2300
31. Torok, Z., Szalontai, B., Joo, F., Wistrom, C. A., and Vigh, L. (1993) *Biochemical and Biophysical Research Communications* **192**, 518-524
32. Berns, D. S., Crespi, H. L., and Katz, J. J. (1963) *J.Am.Chem.Soc.* 8-14
33. Berns, D. S. (1963) *J.Am.Chem.Soc.* **85**, 1676-1678
34. Meilleur, F., Myles, D. A. A., Contzen, J., and Jung, C. (2004) *Biochemistry* 8744-8753
35. Taylor, R. D. and Pfanner, N. (2004) *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1658**, 37-43

36. Arrondo, J. L., Muga, A., Castresana, J., and Goni, F. M. (1993) *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **59**, 23-56
37. Byler, D. M. and Susi, H. (1986) *Biopolymers* **25**, 469-487
38. Dong, A., Huang, P., and Caughey, W. S. (1990) *Biochemistry* **29**, 3303-3308
39. Dong, A., Prestrelski, S. J., Allison, S. D., and Carpenter, J. F. (1995) *J.Pharm.Sci.* **84**, 415-424
40. Kauppinen, J. K., Moffatt, D. J., Mantsch, H. H., and Cameron, D. G. (1981) *Analytical Chemistry* **53**, 1454-1457
41. Surewicz, W. K., Mantsch, H. H., and Chapman, D. (1993) *Biochemistry* **32**, 389-394
42. Venyaminov, S. Y. and Kalnin, N. N. (1990) *Biopolymers* **30**, 1259-1271
43. Venyaminov, S. Y. and Kalnin, N. N. (1990) *Biopolymers* **30**, 1243-1257
44. Kalnin, N. N., Baikalov, I. A., and Venyaminov, S. Y. (1990) *Biopolymers* **30**, 1273-1280
45. Goormaghtigh, E., Cabiaux, V., and Ruyschaert, J. M. (1994) *Subcell.Biochem.* **23**, 405-450
46. Zavodszky, P., Johansen, J. T., and Hvidt, A. (1975) *European Journal of Biochemistry* **56**, 67-72
47. Gericke, A., Smith, E. R., Moore, D. J., Mendelsohn, R., and Storch, J. (1997) *Biochemistry* **36**, 8311-8317
48. Kota, Z., Pali, T., and Marsh, D. (2004) *Biophysical Journal* 1521-1531
49. Vinchurkar, M. S., Chen, K. H. C., Yu, S. S. F., Kuo, S.-J., Chiu, H.-C., Chien, S.-H., and Chan, S. I. (2004) *Biochemistry* 13283-13292
50. Mendelsohn, R., Anderle, G., Jaworsky, M., Mantsch, H. H., and Dluhy, R. A. (1984) *Biochim.Biophys.Acta* **775**, 215-224
51. Palsdottir, H. and Hunte, C. (2004) *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1666**, 2-18
52. Szalontai, B., Nishiyama, Y., Gombos, Z., and Murata, N. (2000) *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes* **1509**, 409-419
53. Kota, Z., Debreczeny, M., and Szalontai, B. (1999) *Biospectroscopy* **5**, 169-178
54. Goormaghtigh, E., Raussens, V., and Ruyschaert, J. M. (1999) *Biochim.Biophys.Acta* **1422**, 105-185

55. Casal, H. L. and Mantsch, H. H. (1984) *Biochim.Biophys.Acta* **779**, 381-401
56. Vigh, L., Horvath, I., Joo, F., and Thompson, G. A. (1987) *Biochimica et Biophysica Acta* **921**, 167-174
57. Henry, E. R. and Hofrichter, J. (1992) *Methods in Enzymology* 129-192
58. Hendler, R. W. and Shrager, R. I. (1994) *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **28**, 1-33
59. Snyder, R. G., Hsu, S. L., and Krimm, S. (1978) *Spectrochim.Acta* **34A**, 395-406
60. Ian, R. and Levin, I. W. *J.Chem.Phys.* 70, 842-851. 1979.
Ref Type: Generic
61. Vigano, C., Smeyers, M., Raussens, V., Scheirlinckx, F., Ruyschaert, J. M., and Goormaghtigh, E. (2004) *Biopolymers* **74**, 19-26
62. Schwinte, P., Voegel, J. C., Picart, C., Haikel, Y., Schaaf, P., and Szalontai, B. (2001) *Journal of Physical Chemistry B* **105**, 11906-11916
63. Murata, N. and Wada, H. (1995) *Biochem.J.* **308**, 1-8
64. Coolbear, K. P., Berde, C. B., and Keough, K. M. (1983) *Biochemistry* **22**, 1466-1473
65. Murata, N. (1989) *J.Bioenerg.Biomembr.* **21**, 61-75
66. Nishida, I. and Murata, N. (1996) *Annu.Rev.Plant Physiol Plant Mol.Biol.* **47**, 541-568
67. Wada, H., Gombos, Z., and Murata, N. (1990) *Nature* **347**, 200-203
68. Murata, N. and Wada, H. (1995) *Biochem.J.* **308**, 1-8
69. Murata, N., Wada, H., and Gombos, Z. (1992) *Plant and Cell Physiology* **33**, 933-941
70. Tasaka, Y., Gombos, Z., Nishiyama, Y., Mohanty, P., Ohba, T., Ohki, K., and Murata, N. (1996) *EMBO J.* **15**, 6416-6425
71. Vigh, L., Los, D. A., Horvath, I., and Murata, N. (1993) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 9090-9094
72. Sinensky, M. (1974) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **71**, 522-525
73. Tasaka, Y., Gombos, Z., Nishiyama, Y., Mohanty, P., Ohba, T., Ohki, K., and Murata, N. (1996) *EMBO J.* **15**, 6416-6425

74. Tasaka, Y., Gombos, Z., Nishiyama, Y., Mohanty, P., Ohba, T., Ohki, K., and Murata, N. (1996) *EMBO J.* **15**, 6416-6425
75. Tasaka, Y., Gombos, Z., Nishiyama, Y., Mohanty, P., Ohba, T., Ohki, K., and Murata, N. (1996) *EMBO J.* **15**, 6416-6425
76. Gombos, Z., Wada, H., and Murata, N. (1994) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91**, 8787-8791
77. Kanervo, E., Aro, E. M., and Murata, N. (1995) *FEBS Lett.* **364**, 239-242
78. Wada, H., Hirasawa, R., Omata, T., and Murata, N. (1984) *Plant and Cell Physiology* **25**, 907-911
79. Ono, T. A. and Murata, N. (1981) *Plant Physiology* **67**, 176-181
80. Ono, T. A. and Murata, N. (1981) *Plant Physiology* **67**, 182-187
81. Kota, Z., Horvath, L. I., Droppa, M., Horvath, G., Farkas, T., and Pali, T. (2002) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 12149-12154
82. Mendelsohn, R., Dluhy, R., Taraschi, T., Cameron, D. G., and Mantsch, H. H. (1981) *Biochemistry* **20**, 6699-6706
83. Cortijo, M., Alonso, A., Gomezfernandez, J. C., and Chapman, D. (1982) *Journal of Molecular Biology* **157**, 597-618
84. Los, D., Horvath, I., Vigh, L., and Murata, N. (1993) *FEBS Lett.* **318**, 57-60
85. Vigh, L., Los, D. A., Horvath, I., and Murata, N. (1993) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **90**, 9090-9094
86. Inaba, M., Suzuki, I., Szalontai, B., Kanesaki, Y., Los, D. A., Hayashi, H., and Murata, N. (2003) *Journal of Biological Chemistry* **278**, 12191-12198
87. Lyons, J. M. (1973) *Annu.Rev.Plant Physiol.* **24**, 445-466
88. Raison, J. K. (1973) *J.Bioenerg.* **4**, 285-309
89. Murata, N., Sato, N., Takahashi, N., and Hamazaki, Y. (1982) *Plant and Cell Physiology* **23**, 1071-1079
90. Murata, N. (1983) *Plant and Cell Physiology* **24**, 81-86
91. Murata, N. and Yamaya, J. (1984) *Plant Physiology* **74**, 1016-1024
92. Murata, N., Ishizakinishizawa, Q., Higashi, S., Hayashi, H., Tasaka, Y., and Nishida, I. (1992) *Nature* **356**, 710-713

93. Moon, B. Y., Higashi, S., Gombos, Z., and Murata, N. (1995) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **92**, 6219-6223
94. Gombos, Z., Wada, H., and Murata, N. (1992) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **89**, 9959-9963
95. Gombos, Z., Wada, H., and Murata, N. (1994) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91**, 8787-8791
96. Tasaka, Y., Gombos, Z., Nishiyama, Y., Mohanty, P., Ohba, T., Ohki, K., and Murata, N. (1996) *EMBO J.* **15**, 6416-6425
97. Greer, D. H., Ottander, C., and Oquist, G. (1991) *Physiologia Plantarum* **81**, 203-210
98. Kis, M., Zsiros, O., Farkas, T., Wada, H., Nagy, F., and Gombos, Z. (1998) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95**, 4209-4214
99. Wada, H. and Murata, N. (1989) *Plant and Cell Physiology* **30**, 971-978
100. Zsiros, O., Kis, M., Mustardy, S., Farkas, T., Varkonyi, Z., Gombos, Z., and Szalontai, B. (2002) *Journal of Plant Physiology* **159**, 403-414
101. Nishida, I. and Murata, N. (1996) *Annu.Rev.Plant Physiol Plant Mol.Biol.* **47**, 541-568
102. Havaux, M. (1998) *Trends in Plant Science* **3**, 147-151
103. DemmigAdams, B. and Adams, W. W. (1996) *Trends in Plant Science* **1**, 21-26
104. van, d. V. M., Kattenberg, M., van Ginkel, G., and Levine, Y. K. (1984) *Biophys.J.* **45**, 1203-1209
105. Strzalka, K. and Gruszecki, W. I. (1994) *Biochim.Biophys.Acta* **1194**, 138-142
106. Gruszecki, W. I. and Sielewiesiuk, J. (1991) *Biochim.Biophys.Acta* **1069**, 21-26
107. Gruszecki, W. I., Grudzinski, W., Banaszek-Glos, A., Matula, M., Kernen, P., Krupa, Z., and Sielewiesiuk, J. (1999) *Biochim.Biophys.Acta* **1412**, 173-183
108. Berglund, A. H., Nilsson, R., and Liljenberg, C. (1999) *Plant Physiology and Biochemistry* **37**, 179-186
109. Subczynski, W. K., Markowska, E., and Sielewiesiuk, J. (1991) *Biochimica et Biophysica Acta* **1068**, 68-72
110. Havaux, M. and Niyogi, K. K. (1999) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**, 8762-8767

111. Havaux, M. and Gruszecki, W. I. (1993) *Photochemistry and Photobiology* **58**, 607-614
112. Tardy, F. and Havaux, M. (1997) *Biochim.Biophys.Acta* **1330**, 179-193
113. Gombos, Z. and Vigh, L. (1986) *Plant Physiology* **80**, 415-419
114. Szalontai, B. and Csatorday, K. (1980) *Journal of Molecular Structure* **60**, 269-272
115. Varkonyi, Z., Masamoto, K., Debreczeny, M., Zsiros, O., Ughy, B., Gombos, Z., Domonkos, I., Farkas, T., Wada, H., and Szalontai, B. (2002) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 2410-2415
116. Miskiewicz, E., Ivanov, A. G., Williams, J. P., Khan, M. U., Falk, S., and Huner, N. P. (2000) *Plant Cell Physiol* **41**, 767-775
117. Celerin, M., Gilpin, A. A., Schisler, N. J., Ivanov, A. G., Miskiewicz, E., Krol, M., and Laudenbach, D. E. (1998) *J.Bacteriol.* **180**, 5173-5182
118. Varkonyi, Z., Zsiros, O., Farkas, T., Garab, G., and Gombos, Z. (2000) *Biochemical Society Transactions* **28**, 892-894
119. Tasaka, Y., Gombos, Z., Nishiyama, Y., Mohanty, P., Ohba, T., Ohki, K., and Murata, N. (1996) *EMBO J.* **15**, 6416-6425
120. Gombos, Z., Wada, H., and Murata, N. (1994) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91**, 8787-8791
121. DemmigAdams, B. and Adams, W. W. (1992) *Annu.Rev.Plant Physiol.Plant.Mol.Biol.* **43**, 599-626
122. van Stokkum, I. H., Linsdell, H., Hadden, J. M., Haris, P. I., Chapman, D., and Bloemendal, M. (1995) *Biochemistry* **34**, 10508-10518
123. Szalontai, B., Kota, Z., Nonaka, H., and Murata, N. (2003) *Biochemistry* **42**, 4292-4299
124. Szalontai, B., Horvath, L. I., Debreczeny, M., Droppa, M., and Horvath, G. (1999) *Photosynthesis Research* **61**, 241-252
125. Lewis, R. N. A. H., McElhaney, R. N., Pohle, W., and Mantsch, H. H. (1994) *Biophysical Journal* 2367-2375