

A 2005-2008-as OTKA periódus során komplex atomerőmikroszkópiai és abszorpciókinetikai méréseket végeztünk különböző biológiai objektumokon: sejteken, membránokon, fehérjéken, oligonukleidokon, stb. Fő célunk a biológiai objektumok szerkezete és működése közti kapcsolat tisztázása. Az eredményeket nemzetközi folyóiratokban közzeltük. Ebben a periódusban 16 megjelent és 2 beküldött cikk készült el. A már megjelent cikkek impakt faktora 37.2.

A 2005-ös év során atomerő mikroszkópos kísérleteket végeztünk élő agyi endotél sejteken, amelyek az agyban a vér-agy gátat alkotják. Ez megakadályozza, hogy idegen anyagok jussanak a vérkeringésből az agyba. Megvizsgáltuk ezen sejtek válaszát a 0.5 M-os mannitol kezelés hatására, amelyről ismert, hogy megnyitja a vér-agy gátat. Kimutattuk, hogy a kezelés hatására a sejtek ozmotikusan folyadékot veszítenek. Térfogatuk, valamint rugalmassági állandójuk csökken. Valószínűleg ennek hatására megszűnik a membránban levő szoros kapcsolatot létrehozó fehérjék közötti kölcsönhatás. A mannitol hiperozmotikus hatását az endotél sejtekre, cikkben közzeltük (Eur. Biophys. J. 2007, 36. 113-120).

A következő évben méréseinket, más kémiai anyagok élő sejtekre gyakorolt hatásának a vizsgálatával folytattuk. Megfigyeltük a kalcium megvonás hatását az endotél sejtekre és ennek a folyamatnak a reverzibilitását, a kalcium koncentráció visszaállítása után. A kalcium megvonás hatására, az eredetileg konfluens kulturában, a sejtek közötti kapcsolatok nagyon gyorsan megszakadnak. A visszaadott kalcium hatására a sejtek közötti kapcsolatok pár óra alatt helyreállnak. A sejtek mozgását a kapcsolatok helyreállása folyamatában, sorozatkép készítésével, követni tudtuk. A következőekben végigvittük, a megkezdett tanulmányt, melyben a kalcium megvonás hatását vizsgáltuk az endotél sejtekre. Kimutattuk, hogy kalcium megvonás hatására a konfluens sejt-kultúrában a sejtek közti kapcsolat nemcsak hogy felszakad hanem az eredetileg hosszúkás sejtek gömbszerűvé alakulnak és megváltozik mechanikai rugalmasságuk. A kalcium visszaadásakor a sejtek reverzibilisen visszanyerik eredeti alakjukat, kapcsolataikat és mechanikai tulajdonságukat. A munka eredményeit egy orvosi folyóiratban közzeltük le (Phys.

Med. Biol. 2007, 52. 6261-6274). Ez a munka az elkövetkező években is folytatódik, más anyagoknak az endotél sejtekre gyakorolt hatásának a vizsgálatával.

Szén nanocsövekkel végzett méréseink során kimutattuk, hogy a fotoszintetikus reakciócentrumok kötődnek az egyfalú szén nanocsövekhez és ez a kötődés hosszú időre stabilizálja a reakciócentrumok működését. A megkezdett munkát, a szén nanocsövek és a fotoszintetikus reakciócentrumok közötti kölcsönhatásról, a következő évben folytattuk. Az eredményeinket cikkben feldolgoztuk (J. Phys. Chem. B. 2006, 110. 21473-214479). Az eredmények nemcsak elméleti szempontból ígéretesek, hanem új biotechnológiai alkalmazások lehetőségét is előrevetíti. Tulajdonképpen a fotoszintetikus reakciócentrum, szén nanocső komplex új biotechnológiai anyagnak ígérkezik.

A reakciócentrumok működését vizsgáltuk a fiziológiailag fontos foszfolipidekből készült vezikulákban is. Kimutattuk, hogy a foszfolipideknek specifikus szerepük van a reakciócentrumok működésében. Követtük a fény által gerjesztett reakciócentrumok kinetikai állandóinak változását a minta hőmérsékletének a függvényében, amiből a folyamata termodinamikai paramétereit tudtuk meghatározni. Az eredményeinket cikkben foglaltuk össze (Bioelectrochem. 2007, 70. 18-22).

Egyes oligonukleotidok csillám felületére történő kötődésének a vizsgálatánál megfigyeltük, hogy nagyon nagy hígításnál sajátos, fonalszerű struktúrák jelennek meg, amelyek valószínűleg az oligonukleotidok egymáshoz kapcsolódásából alakulnak ki. Vizsgáltuk az oligonukleotidok önszerveződését csillám felületen és az önszerveződés lehetőségét különböző külső körülmények függvényében, mint például a pH, ionerősség, felület minősége, koncentráció. Tisztáztuk a külső körülmények szerepét az önszerveződés kialakulására. Egy nagyon fontos kritérium az önszerveződés során, hogy az oldatban minél kevesebb só legyen és a pH-ja 3.3 és 4 között legyen. A megfigyeléseinket cikkben leközöltük (J. Phys. Chem. C. 2007, 111. 17032-17037). Az önszerveződés folyamatának a feltérképezése szerepet

játszhat az élet eredetének a megértésében. Az élet kialakulásakor az információkódoló nukleinsav lánc, feltételezések szerint a montmorillonit agyagon alakulhatott ki. A csillám kémiai összetétele nagyon hasonlít ezen agyag összetételére.

Tanulmányoztuk az oligonukleotidok és egy specifikus peptid az SV40 nucleáris lokalizációs szignál peptid kötődését és ennek hatását az oligonukleotidok membránon keresztüli transzportjára. Az oligonukleotidok koncentrációjának a függvényében megfigyeltük az anyag kicsapódását a szignál peptidre egy jól meghatározott koncentrációnál (20  $\mu$ M). Megfigyeltük a szignál peptid működését ezen körülmények között. A munkát egy cikkben tettük publikussá (Arch. Biochem. Biophys. 2006, 454. 146-154)

Elkezdtek kifejleszteni azt a mérés technikát, amely során a mérő tűre kapcsolt feszültséggel feltérképezhetjük a minta lokális dielektromos állandóját. Ehhez egy speciális feszültségszabályozót és árammérőt készítettünk. Elkezdtek a száraz bakteriorodopszin mintákon a méréseket. Egyelőre ez a kísérletsorozatunk nem járt eredménnyel. Nem találtuk meg azokat a paraméter értékeket, amelyeknél mérhető ez a fizikai állandó. A kísérletek folytatódnak a közeljövőben.

Tanulmányoztuk a hidrogén-deutérium kicserélődés hatását a retinál fehérjék fotociklusára. Két retinál fehérjétt tanulmányoztunk alaposabban, a proteorodopszint és a pharaonis halorodopszint. Az elvégzett mérések alapján valószínűsítettük, hogy a pharaonis halorodopszin azid jelenlétében hidroxid iont szállít a sejtfalon keresztül, szemben az eddig feltételezett protonnal. Megvizsgáltuk a különböző halid ionok hatását a pharaonis halorodopszin fotociklusára. A halorodopszinon végzett méréseinkből két cikk jelent meg (J. Photochem. Photobiol. B. 2005, 79. 145-150; J. Photochem. Photobiol. B. 2006, 82. 16-20,)

Vizsgálatokat kezdünk a bakteriorodopszinnál, hogyan befolyásolja a fotociklust, ha a két módon készült retinál hiányos, „fehér” membránokhoz

visszaadjuk a retinált, hogy a bíbor membránokat rekonstruáljuk. Kimutattuk, hogy a fakított és retinál visszakötött bakteriorodopszin fehérje, az irodalmi adatokkal ellentétben komoly kinetikai változásokat szenved. Bár a fotociklus során mindig ugyanazok a köztes állapotok jelennek meg, ezek kinetikája függ a membránok különböző kémiai anyagokkal való kezelésétől. Az eredményeinkről egy cikkben számoltunk be (J. Photochem. Photobiol. B. 2007, 85. 140-044).

Kimutattuk, hogy az orientált bakteriorodopszin a fénygerjesztés során terrahertzes sugárzást bocsájt ki. Ez a sugárzás a fehérjében létrejövő nagyon gyors, elsődleges töltésszeparációból származik és több fázisból áll. A kísérletek leírása mellett a jelenség elméleti magyarázatát is megadtuk. Ezen elmélet felhasználásával a sugárzás egyik komponense az elsődleges protonmozgással volt azonosítható. Az eredményeket egy cikkben írtuk le (Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2008, 105. 6888-6893).

Abszorpciókinetikai és elektromos jel méréseket végeztünk, egy újonnan felfedezett retinál fehérjén, a leptospheria rodopszinon. Ez a retinál fehérje az eukariota *Leptospheria maculans*-ban található. A bakteriorodopszinhoz hasonlóan protont pumpál a sejtfaon keresztül. Méréseink segítségével meghatároztuk azt a töltés mozgást, ami akkor jön létre, amikor a fotociklusa során ez a fehérje is töltést szállít a membránon keresztül. Ami érdekes, hogy leptospheria rodopszinnál csak negatív elektromos jelet tudtunk mérni, szemben a bakteriorodopszin kétfázisú elektromos jelével (Dig. J. Nanomat. Biostruct. 2007, 2. 265-269).

Elkezdtek egy másik frissen felfedezett retinál fehérje a xantorodopszin fotociklusának a tanulmányozását is. Ennek a fehérjének az érdekessége, hogy rendelkezik egy xantin antennával, ami nagyobb kvantumhatásfokot eredményez a működése során. A xantinnek a bakteriorodopszin retináljánál rövidebb hullámhosszon van az abszorpciós maximuma. Az általa elnyelt foton energiáját Förster féle energiatranszferrel átadja a retinálnak, ahol ez protonmozgató erővé válik. Ezt a munkát a külföldi partner, Lanyi K. Janostól kapot membrán

preparátumon végezzük, az ő irányítása segítségével. A kísérleti munka nagyrésze már lezárult. A eredmények feldolgozása folyik.

Az atomerő mikroszkópiában egy új technikát dolgoztunk ki a retinál fehérjék, mint például a bakteriorodopszin konformációváltozásának a vizsgálatára. A fehérjét a mérő tű rugólapkájára orientáltan rakatjuk le, külső elektromos tér segítségével. Megvilágítás során működésükből következően a fehérjék konformációváltozást szenvednek és az elmozduló fehérjék elhajlítják a rugólapkát. Ez a mozgás az atomerőmikroszkópos méréstechnikával nagyon jól mérhető és jellemzi a konformációváltozást, vagyis a térfogat növekedést vagy csökkenést. Poláros fényvel való gerjesztés segítségével meghatároztuk a konformációváltozás irányát a retinál tengelyéhez viszonyítva. Bakteriorodopszin esetében kimutattuk, hogy a konformációváltozás iránya függ attól, hogy a retinál fehérje transzporttáló, vagy nem transzportáló fotocikluson megy keresztül. A kísérleteinket cikkben leírtuk (Langmuir 2007, 23. 7225-7228) és bemutattuk egy nemzetközi konferencián (International Symposium on Retinal Proteins: Experiments and Theory, September 23-26, 2007, Bremen, Germany). A munkát tovább folytatjuk, kiterjesztve vizsgálatainkat savas bíbor és mutáns bakteriorodopszinra, valamint más retinál fehérjékre. Ezáltal tisztázható lesz a konformációváltozás és a különböző ionok pumpálása közti kapcsolat.

Atomerő mikroszkóppal tanulmányoztuk a *Bradyrhizobium japonicum*, nitrogénfixáló baktériumot. A baktérium szimbiózisban él a szója növényvel. Egy mutáns törzset a vad típusúval hasonlítottuk össze. Úgy a sejt alakjában, mint a sejt rugalmasságában jellegzetes változásokat figyeltünk meg a mutáció hatására. Az atomerő mikroszkópos mérésekkel párhuzamosan más analíziseket is végeztünk, amely során egy új toxin-antitoxin komplexet sikerült kimutatni a baktériumban. A továbbiakban próbáljuk megérteni a változások hatását a sejt működésére. Ehhez, különböző anyagokkal kezelve a sejteket, vizsgáljuk a létrejövő alaki és mechanikai változásokat. Az eddigi megfigyeléseinket egy cikkben írtuk le (Mol. Plant Microbe Int. Beküldve 2009).

Foglalkoztunk plazmid DNS-ek vizsgálatával is. Célunk a plazmid DNS enzimátikus kezelése során létrejövő különböző konformációk feltérképezése és a molekuláris események megértése. Tisztáztuk azokat az AFM leképezési paramétereket, amelyek biztosítják a plazmid DNS-ről alkotott jó minőségű képeket.

Egy új terület a szilárd hordozó felületen létrehozott mesterséges membránok és az ezekhez kötött fehérjék tanulmányozása. Ezek poli-L-lizin és poli-L-glutaminsavval kezelt csillám felületen létrehozott lipid kettősrétegek. Intézetünkben kidolgozták a technikát, hogy a membránok, a csillám molekulárisan sima, nagy felületén egyenletesek legyenek.

Első alkalmazásként megvizsgáltuk az indolicidin hatását ezekre a membránokra. Az indolicidin egy 13 aminosavból álló antibakteriális peptid. A peptid nagy részét triptofán (5 db) és prolin (3 db) alkotják. Antibakteriális hatásmechanizmusa még nem teljesen tisztázott. Sikerült AFM képet alkotni arról, ahogy az indolicidin, aránylag alacsony koncentrációban, tönkreteszi a mesterséges membrán kettősréteget. Vizsgáltuk a hatás megjelenésének koncentrációfüggését és kinetikáját. Érdekes megfigyelés, hogy a fehérjével szorosan pakolt bíbor membránt csak az élein tudja megtámadni. Ezekről a kísérletekről egy cikkben számoltunk be (Eur. Biophys. J. beküldve 2009).

Vizsgáltuk a kazeinnak a mesterséges membránon való kötődését és a kalcium kloridnak valamint a foszfátnak a hatását úgy a membránra, mint a megkötött kazeinre is. A kazein és a foszfát membránhoz kötődése során nem változtatta meg a membrán mechanikai tulajdonságát, míg a kalcium keményítette a membránt. Ezen megfigyeléseket az ATR-FTIR spektroszkópiai mérésekkel összekapcsolva értelmezni lehet a kazeinnek a membránokkal történő kölcsönhatását.

A retinál fehérjék kutatásában létrejött nemzetközi kollaboráció során két munkát említenék meg. Az egyik során a külső elektromos térnek a fotociklusra

gyakorolt hatását vizsgáltuk, bakteriorodopszin orientált és nem orientált száraz mintákon. A külső tér befolyásolja a fotociklus menetét, mivel hat a köztes állapotok közötti energiabarrierre. Ezt a hatást modelleztük és illesztettük a mérési eredményekhez (Eur. Biophys. J. 2007, 36. 199-211). Ezt a munkát litván kutatókkal közösen végeztük.

A másik együttműködési munkában a bakteriorodopszint, mint integrált áramköri elemet vizsgáltuk. Sikerült bakteriorodopszin-n szilícium- fénoxid csatorna FET fotoérzékelőt létrehozni és a működési paramétereit meghatározni (Optics Lett. 2007, 32. 500-502). A munkát az Ann Arbor, Michigan egyetem kutatócsoportjával közösen végeztük. Egyre több ilyen alkalmazás mutatja, hogy a bakteriorodopszin ígéretes anyag a biotechnológia és ezen belül is főleg a bioelektronika területén.