

A beszámolóban nem feltétlenül tartom be a munkák időbeli sorrendjét, a problémák szerint is csoportosítom az anyagot, így a tematikailag összetartozó részek kerülnek inkább együvé.

### **Átvezető munkák a jelen OTKA pályázat feladataira:**

(i) **Membrádinamika, lipid-fehérje kölcsönhatások (kerek történet):** Tekintettel arra, hogy a vállalt feladatoknak jelentős részét képezte modell és biológiai membránok szerkezetének, dinamikájának vizsgálata, már a jelen pályázat beindulása előtt végeztünk olyan kísérleteket és dolgoztunk olyan kiértékelési módszereken, amelyek kellettek a tervezett munkákhoz. Ennek keretében új kiértékelési módszert dolgoztunk ki a biológiai membránokban levő fehérjék és lipidek növekedő hőmérséklet hatására bekövetkező szerkezet- és dinamika változásának, illetve a két membrán komponens kölcsönhatásának nyomon követésére. Módszerünkkel, összehasonlítva a lipid-, illetve a fehérje-dinamika hőmérsékletfüggését, megállapítottuk, hogy alacsony hőmérsékleti stressz körülményei között elsősorban a lipidek, magas hőmérsékleti stressz esetén pedig a fehérjék dinamika/szerkezet változásai a meghatározóak a biológiai membrán viselkedésében. Ezekből a munkákból két publikációnk jelent meg. Az elsőn, mivel annak érdemi része már az OTKA pályázat beindulása előtt elkészült, és csak publikálása esett a jelen pályázat idejére, nem szerepel az OTKA támogatás (*PMC Biophysics (2009) 2:1*). Második publikációnk, ami magában foglalta a lipid-fehérje kölcsönhatások vizsgálatát is, 2009 végén jelent meg és ez már tartalmazza az OTKA támogatásra való utalást (*Biochemistry (2009) 48, 10120-10128*).

(ii) **Lipid raftok (befejezetlen):** A leendő minták informatívabb vizsgálata érdekében szisztematikus kutatást indítottunk a lipideknek a membránfehérjékre gyakorolt hatásának felderítésére, hogy kiderítsük, mi az a minimális lipid tartalom, illetve az a lipid összetétel, ami még lehetővé teszi egyes membránfehérjék működését. Ehhez különböző módszerekkel (sűrűség gradiens, fázisszeperáció) preparáltunk membránokat, illetve detergenssel avatkoztunk be a preparált membrán szuszpenziók lipid összetételébe. Ezeket a vizsgálatokat a későbbi pályázat módosítás miatt abba is hagytuk volna, de időközben megkeresett bennünket pontosan ebben a témában Brigitta Norling (School of Biological Sciences, Nanyang Technological University, Singapore), ezért a munkát, részben az általuk küldött membrán preparátumokon, tovább folytattuk, a külföldi partner által felvetett kérdéseket megválaszoltuk. Ennek a munkának a ránk eső részét elvégeztük, az anyag publikálása a külföldi partner egyelőre hiányzó adataitól függ. A projekt általunk elvégzett, és a biológiai kutatásokban általánosítható részéből előadást tartottunk a 42. Sümegi Membrán-transzport Konferencián (*Membrán preparátumok: Mivel is dolgozunk? Szalontai Balázs, Bérczi Alajos, Ferencz Csilla, Brigitta Norling*).

### **Pályázat módosítás:**

A munka során kezdetben az eredeti munkaterv szerint megpróbáltuk a polielektrolit rétegekre felvitt modell és biológiai membránokat tanulmányozni, abból a szempontból, hogy megfelelően záró lipid kettős réteget képeznek-e a polielektrolit filmek felületén, aminek révén transzportfolyamatok vizsgálatára alkalmas kompartmentek alakulhattak volna ki. Be kellett látnunk azonban, hogy a makroszkopikus méretű polielektrolit felszínen mindig keletkeznek olyan "hibák", amelyeknél az ionok át tudnak menni, ezért nem sikerült megvalósítanunk az elméletileg megkívánt nagy ellenállású rétegeket. Mivel időközben olyan módszerek láttak napvilágot, amikkel egészen bizonyosan jobb eredményeket lehetett elérni, mint az általunk eredetileg elképzelt rendszerrel, feladtuk az eredeti irányvonalat, és az OTKA-tól engedélyt kértünk, és kaptunk valamelyes iránymódosításra. Ezek után, nem elhagyva a polielektrolit filmeket, de csak mint megfelelő kísérleti körülményeket kínáló munkaeszközöket kívántuk felhasználni őket olyan, továbbra is nanométer skálájú kísérletekben, ahol a polielektrolit filmek révén tudjuk beállítani annak a felszínnek tulajdonságait, amin molekulák kölcsönhatásait akartuk vizsgálni.

**Kantumdot-bakteriorhodopszin közötti energiaátadás (befejezetlen):** A nanotechnológiai és a

polielektrolitokat alkalmazó megközelítésnél maradva, a strasbourgi Charles Shadron Intézettel a Groma Géza által folytatott együttműködés keretében, megvizsgáltuk a polielektrolit filmbe ágyazott bakteriorhodopszin (bR) és a további polielektrolit rétegek révén beállított távolságba helyezett kvantumdotok közötti fluoreszcenciás energiaátadás lehetőségét. Sikerült olyan bR-polielektrolit-kvantumdot architektúrát kialakítanunk, amiben megvalósult az energiaátadás, azaz az elvi lehetőséget megmutattuk. A rendszer tökéletesítése (elsősorban a kvantumdotok fejlesztése révén) a francia partnerektől függött, akik végül, a kvantumdotok körüli nehézségek miatt úgy döntöttek, hogy nem folytatják ezt a projektet, így az nálunk is félbemaradt. (Esetleges maradandó hozadéka, hogy a francia partner egyik munkatársát szegedi tartózkodása alatt bevezettük az infravörös spektroszkópiába, a kísérletek elvégzésébe).

**A kazein micellák szerkezete (kerek történet):** A probléma, amit megvizsgáltunk, a kazein, az emlősök tejében legnagyobb mennyiségben jelen levő fehérje micelláinak szerkezete volt. Ezek a micellák alapvető fontosságúak a Ca-foszfát szállításában, mert az őket felépítő  $\alpha$ -, $\beta$ -kazein molekulák magukban kicsapódnának a  $\text{Ca}^{++}$  hatására, ezzel szemben, a micellákon egy, a  $\text{Ca}^{++}$ -ra nem érzékeny  $\kappa$ -kazein “borítás” van, ami lehetővé teszi, hogy a micellák oldatban maradjanak. Továbbá, az aggregálódott kazein molekulák közé épülnek be azok a Ca-foszfát nanoklaszterek, amiket a csontképződés helyeire kell szállítani. Az elmúlt 50 év során többféle módszerrel is vizsgálták a kazein micellák szerkezetét, tekintettel azok élettani, és élelmiszer technológiai fontosságára, és két, egymásnak ellentmondó modellre jutottak. Azért csak modellre, mert az alkalmazott technikák csak a kész micellák szerkezetét mutatták meg, maga a képződés folyamata homályban maradt. Az eldöntetlen kérdés az volt, vajon a kazein micellák előzetesen létrejött ún. mini micellákból épülnek fel, vagy az egyes kazein molekulák a Ca-foszfát nanoklasztereken keresztül kapcsolódva építik fel a micellákat. Mindkét elképzeléshez voltak kísérleti adatok, de pl. egyik modell sem tudta megmagyarázni, hogyan áll le a micellák képződése, és hogyan kerülnek a  $\kappa$ -kazein molekulák a micellák felszínére.

Mi azzal, hogy a polielektrolit felszíneket, mint olyan reakció felszíneket használtunk, amiken a molekulák kölcsönhatása rendkívül kis koncentrációnál megvalósítható (három nagyságrenddel kisebbnél, mint az addigi kísérletekben), és hogy olyan mérési módszereket használtunk – a teljes visszaverődéses Fourier transzformációs infravörös spektroszkópiát és atomerő mikroszkópiát – amik lehetővé tették ezeknek a rendkívül kis koncentrációk mellett létrejövő aggregációknak szinte molekuláról molekulára való nyomon követését. Így fel tudtuk deríteni a micella képződéséhez vezető lépések mibenlétét és sorrendjét. Első lépésben azt mutattuk meg, hogy az  $\alpha$ -kazein molekulák aggregációja úgy valósul meg, hogy negatívan töltött foszfoszeril csoportjaikhoz kapcsolódik a Na-foszfát nanoklaszter, amiknek továbbra is negatív felszínéhez az  $\alpha$ -kazeinek pozitív csoportjaikkal kapcsolódnak, szabadon hagyva negatív foszfoszeril csoportokat a további Ca-foszfát kötéshez, és így tovább. Az is kiderült, hogy, feltehetően a kazeinek amfifil természete miatt, a molekulák hidrofób részei is összetapadnak, és mintegy 20 nm átmérőjű aggregátumokat alkotnak, amelyek azonban a felületükön levő Ca-foszfát nanoklasztereken keresztül képesek más, ugyanilyen egységekkel kapcsolatba lépni. Ez az eredmény megmagyarázta a korábbi, pl. elektron mikroszkópiával megfigyelt szintén kb. 20 nm-es képződmények eredetét, és azt is megmutatta, hogy a Ca-foszfát nanoklasztereken keresztül épülnek fel a micellák. Ezt a munkánkat meg is jelentettük: (*Journal of Biological Chemistry* (2010) 285, 38811-38817).

Nyitott kérdés maradt azonban a micella képződés befejeződése, illetve a  $\kappa$ -kazein molekulák szerepe. Vizsgálataink második részében először  $\alpha$ -kazein $\leftrightarrow$ Ca-foszfát aggregátumokat építettünk fel a polielektrolit filmek felszínén, és erre adszorbeáltattunk  $\kappa$ -kazein molekulákat. Megállapítottuk, hogy amíg Ca-foszfát nanoklasztereket építünk be a kazein molekulák közé, addig bármilyen  $\alpha$ -, $\kappa$ -kazein sorrendi kombinációban gyakorlatilag vég nélkül építhetőek fel a kazein micellák. Ha azonban nincs jelen Ca-foszfát, akkor csak a  $\kappa$ -kazein építhető rá az  $\alpha$ -kazein felszínre, fordított sorrendben nincs aggregáció. Azt is megmutattuk, hogy az utoljára aggregálódott  $\kappa$ -kazein molekula rétegre már nem lehet sem  $\alpha$ -, sem  $\kappa$ -kazeint felvinni. A kazeinek másodlagos

szerkezetének vizsgálata során kiderült (itt meg kell említeni, hogy a kazeinek eredetileg meghatározott másodlagos szerkezet nélküli rendezetlen fehérjék (intrinsically disordered proteins), amiknek csillaga igencsak feljövőben van), hogy a  $\kappa$ -kazein molekulák szerkezete sokkal "lágyabb", mint az  $\alpha$ -kazeineké. Valószínűleg ezért kitöltik, lezárják azokat a helyeket az  $\alpha$ -kazeinek felszínén, amik egyébként a Ca-foszfát nanoklaszterekkel való kölcsönhatást biztosítják. Így a  $\kappa$ -kazeinek képesek befejezni, megállítani a kazein micellák képződését. Természetesen ezek a kísérletek is modell kísérleteknek tekinthetők, de a valósághoz nagyon közeli modelleknek, a megfelelő polielektrolit felszí biztosításán kívül (ami csak a kazein aggregáció első rétegét befolyásolhatta), nem avatkoztunk be semmilyen módon a természetes reakciókba. Ezért azt gondoljuk, hogy eredményeink jelentős előrelépést jelentenek a kazein micellák kialakulásának, szerkezetének megértésében. A kazeinnel kapcsolatos munkáink második részét is publikáltuk: (*European Biophysics Journal* (2012) 41:959-968).

### **Az teljes visszaverődésen alapuló infravörös spektroszkópai módszer (Attenuated Total Reflection (ATR)) lehetőségeinek tágítása – felület-erősített infravörös spektroszkópia:**

(i) **Membrán szerkezet vizsgálatok (folyamatban):** A biológiai membránok szerkezetének, a bennük levő lipidek és fehérjék kölcsönhatásának vizsgálatok nagyon fontos lenne minél inkább megközelíteni a natív állapotokat, hiszen mint feljebb említett, a lipid raftokkal foglalkozó vizsgálatainkból egyértelműen kiderült, hogy a ki-ki által ilyen-olyan membránpreparátumoknak nevezett vizsgálati anyagok mindig nagyon függenek a preparálási eljárástól, és leginkább csak különböző fehérje-lipid komplexeknek tekinthetők. Ráadásul az esetek egy jó részében a preparálási módszer kényszerít egymás mellé olyan membrán összetevőket, amik a valóságban egyáltalán nem úgy helyezkednének el.

Az ATR módszer nagyon jó lehetőséget biztosít membránok vizsgálatára, hiszen a fényvezetőként szolgáló kristály felszínére tapasztott mintába csak kis mélységben (kb. az aktuális infravörös hullámhossz fele) hatol be. Be kell látni azonban, hogy ha *in situ*, netán *in vivo* akarunk mérni csak a membránokban zajló folyamatokat, jelenségeket, szerkezeteket, akkor az ATR eredeti behatolási mélysége (ami a mikrométer tartományba esik) túl nagy, a valójában megmért spektrumok nagyrészt olyan molekulákból származnak, amik kívül esnek a membránokon (Amitől nagyon sok vizsgálatban, az alkalmazott metodikától függetlenül, sajnos, nagyvonalúan el szoktak tekinteni.).

Van azonban lehetőség a behatolási mélység csökkentésére, a felület-erősített infravörös (Surface-Enhanced Infrared Absorption (SEIRA)) spektroszkópia alkalmazásával, amire már van néhány kísérleti eredmény is az irodalomban. A módszer azon alapszik, hogy egy nagyon vékony (néhány-szor tíz nanométer) Au-filmet készítünk a teljes visszaverődést biztosító kristály (Si) felszínére, és erre tesszük a vizsgálandó anyagot. Itt nem részletezendő, elsősorban elektromos térhatások miatt, mintegy 5-20 szoros erősítés érhető el, amellett, hogy a behatolási mélység 8-10 nm-re csökken. Ezt, fokozatosan felépített polielektrolit filmekkel, be is bizonyítottuk, 4-5-polielektrolit réteg után már nem nőtt az infravörös abszorpció, mert a további polielektrolit rétegek már nem "látszottak" az Au-rétegtől távolodva. Azaz, a mintának csak ilyen vastagságú részéről kapunk információt. Ez már a biológiai membránok vastagságának tartománya. Sőt, mint azt méréseink megmutatták, a biológiai membránok esetében, ahol normál ATR vizsgálatoknál a membránoknak mind fehérje, mind lipid molekulái nagyon jól látszanak, a SEIRA mérésekben, a felületre adszorbeáltatott membránokról csak fehérje jeleket kaptunk, lipidekről származókat nem, nyilván, mert a membránfehérjék extra-membrán részei 8 nm-nél távolabb tartották a lipid kettős réteget az Au-felszíntől. Ugyanakkor tisztán lipidekből álló modell membránokról kiváló lipid spektrumokat lehetett felvenni.

(ii) **A víz szerkezetének megváltozása Hofmeister sók jelenlétében, és ennek a változásnak hatása a fehérjék szerkezetére (folyamatban):** Az intézetünkben, Dér András által vezetett, a Hofmeister effektus kutatás abba a fázisba jutott, hogy sikerült egységes elméleti leírását adni az effektusnak. Azonban a elmélet igazolására, bizonyító erejű kísérleti eredményekre is szükség van.

Ezért egyrészt ATR kísérleteket végeztünk annak igazolására, hogy a kozmo-, illetve kaotróp Hofmeister sók hogyan befolyásolják a bakteriorhodopszin molekula fázisátmenetét, illetve másodlagos szekezetét a 70-90 °C tartomány alatt és fölött. Eredményeinkből kiderült, hogy az elmélet jóslatának megfelelően, az általában szokásos hatással ellentétesen hatnak a Hofmeister sók a bR fázisátmenetére, merthogy a bR molekula szerkezete is ellentétes a fehérjékben általában megszokottal, hiszen az alacsonyabb hőmérséklet tartományban áll a nyitottabb szerkezetű  $\alpha$ (II) hélixekből, és magasabb hőmérsékleteknél tartalmazza a zártabb  $\alpha$ (I) hélixeket. Ennek a munkának csak az infravörös spektroszkópiai részét végeztük mi, a munka többi részét Dér András és munkatársai csinálták, ***közlésre való beküldése most van folyamatban.***

A fentebbi bR-en végzett mérések, illetve a mi saját membránszerkezet vizsgálataink arra vezettek bennünket, hogy nagy szükség lenne a víz szerkezetének csak az oldott molekulák, illetve az adott Hofmeister só anionjának közvetlen környezetében való vizsgálatára. Ezért Dér Andrással közösen most dolgozunk ki egy olyan mérési rendszert, ami a SEIRA módszert hasznosítaná az ilyen mérésekre, hiszen az ezzel vizsgálható 8-10 nm-es rétegben döntően a molekulákhoz, illetve az ionokhoz kapcsolódó vízmolekulákról kapnánk információt. Itt meg kell jegyezni, hogy a SEIRA mérésekhez megfelelő Au-réteg kialakítása nem triviális, nagyon sok kísérletet végeztünk kétféle preparálási rendszerrel is, mielőtt eldöntöttük, hogy melyik módszert fogjuk használni. Az elkészített filmek felszínét minden esetben AFM-val ellenőriztük, és mostanra jutottunk el odáig, hogy rutinszerűen tudunk reprodukálható kb. 30 nm vastag, 5-10 nm felszíni egyenetlenséggel rendelkező Au-rétegeket készíteni. Ezekben az Au-rétegeken meg tudtuk figyelni adszorbeálódott lipidek, fehérjék, illetve tiol kötéssel immobilizált molekulák SEIRA spektrumait. A továbbiakban ezzel a módszerrel akarjuk majd a Hofmeister effektus molekula szintű vizsgálatát megkísérelni. Azért ez az óvatos kijelentés, mert egyáltalán nem biztos, hogy próbálkozásaink egyértelmű sikerre vezetnek majd.

#### **Egyéb tevékenység:**

Gombos Zoltán (MTA SZBK Növénybiológiai Intézet) csoportjával (akikkel több évtizedes folyamatos együttműködésünk van) közösen egy könyvfejezetet írtunk korábbi munkáink alapján:

*The Role of Membrane Structure in Acclimation to Low-Temperature Stress*

*Balázs Szalontai, Ildikó Domonkos, and Zoltán Gombos*

*Chapter 11, in Photosynthesis: Plasmid Biology, Energy Conversion and Carbon Assimilation, Advances in Photosynthesis and Respiration 34, pp. 233-250,*

*J.J. Eaton-Rye, B.C. Tripaty and T.D. Sharkey (eds.),*

*Springer Science+Business Media B.V. (2012) DOI 10.1007/978-94-007-1579-0\_11.*