

PROTONVEZETÉS FEHÉRJÉKBEN

Maróti Péter, Gerencsér László SZTE Biofizikai Tanszék

Mózes ekkor kinyújtotta kezét a tenger fölé. Az Úr egész éjjel tartó erős keleti széllel visz-szaszorította a tengert és kiszárította. A víz kettévált, és Izrael fiai a száraz tengerfenéken vonultak át, miközben a víz jobb és bal felől úgy állt, mint a fal. (Biblia, Kivonulás könyve, 13, 21-22). Mózes kinyújtotta kezét a tenger fölé. Erre a víz napkeltekor visszaáramlott régi helyére, amikor az egyiptomiak éppen arra menekültek. Az Úr besodorta őket a habok középebe. (Biblia, Kivonulás könyve, 14, 27)

Ámulatba ejtő a hasonlóság a kiválasztott népnek a Sás-tengeren való átvonulása, illetve a protonoknak hidrogénhidakkal szorosan összekötött rendszeren, például vízben való különlegesen hatékony vezetése között. A proton a hidrogénhidak által meghatározott irányban nagy sebességgel vándorolhat, ha előtte felbomlik, utána pedig bezáródik a hidrogénhid-kötés. Ezt a mechanizmust a látónki képességű *Theodor Grotthus* ismerte fel éppen két évszázaddal ezelőtt (1806), amikor még meg sem született az anyag Dalton-féle atomelmélete (1808), és még nem is ismerték a víz helyes kémiai szerkezetét. Az állandósult protonvezetéshez a H-hidakkal összekötött láncnak legalább kétféle mozgást kell végeznie, hogy a proton tényleges elmozdulás nélkül kerülhessen a lánc elejéről a végére, mint ahogyan az álló és egymással érintkező biliárdgolyók közül a szélső kilendül, ha a másik szélről centrálisan egy másik biliárdgolyót ütköztetünk. Az egyik mozgás az *ugrás*, amelynek során minden proton a vezetés irányába eső szomszédos helyre kerül, a másik a *forgás*, amellyel a H-híd hálózat az eredeti alakzatát veszi fel.

A proton kiemelkedően nagy mozgékonyságának egyszerűen az az oka, hogy megnövekedett a lépéshossz a véletlenszerű vándorlás során: a proton egy vízmolekula átmérőjének megfelelő távolságot (0,25 nm) lép a víz rotációs relaxációs ideje alatt. A protonvándorlás sebességének meghatározó lépése a H-kötések koordinált átrendezése. Ennek megfelelően az aktivációs energia csekély, közelítőleg 2,5 kcal/mol, amely tipikusan a víz-víz H-kötés felszakításából származik.

Biológiai jelentőségű protonvándorlás

A protonvándorlás a biológiai rendszerekben is fontos. Számos olyan biológiai folyamat ismert, amelynek lényeges eleme a kis vagy nagy távolságú protonátadás (protontranszfer – PT). Az előbbire példa az enzimek aktivitásában fontos szerepet játszó savbázis-katalízis, amelyben a PT nagyon lokalizált, és elsődleges célja a szomszédos csoportok, például egy aktív helyen levő aminosav és egy szubsztrát közötti protonátadás (Eigen, 1964). Noha a katalitikus helyekről a vízmolekulák általában kiszorulnak, az enzim aktív helye és az oldat között azonban speciálisan rendezett láncolatuk alakulhat ki. Ez az orientált szerkezet könnyen polarizálódik a katalitikus helyen bekövetkező töltésselölődásra (PT-re). Jellemző példa a *szuperoxid dizmutáz* (SOD) enzim, amely az emlősök szöveteiben, szív, máj, agy stb., vérben, növényekben, algákban és aerob baktériumokban nagyon elterjedt. A szervezet méregtelenítése a nagyon roncsoló hatású szuperoxidtól (O_2^- -tól) ún. „ping-pong” mechanizmussal történik, amelynek második reakciójában protonátadás zajlik: $SOD + O_2^- \rightleftharpoons SOD^- + O_2$ és $SOD^- + O_2^- \rightleftharpoons SOD + H_2O_2$.

Nagy hatótávolságú PT jellemzi a protonpumpaként működő fehérjéket például *bakteriorodopszint*, *citokróm oxidázt*. Ezek olyan bioenergetikai folyamatok motorjai, amelyek protongradient építenek fel a biomembránok két oldala között, és ezzel létrehozzák az élőlények egyik legfontosabb, gyorsan felépíthető és felhasználható szabadenergia-forrását (Sass et al., 2000). Mivel ez a terület saját kutatásainkhoz kapcsolódik, később külön fejezetben mutatjuk be, hogyan valósulnak meg a nagy hatótávolságú PT szerkezeti, energetikai és kinetikai feltételei a fotoszintetikus baktériumok *reakciócentrumában* (RC). Mielőtt erre áttérnénk, még két gondolatot szeretnénk fűzni az általános bevezetőhöz.

Az egyik, hogy a protont transzportáló fehérjékben is kialakulhatnak a Grotthus-mechanizmus működésének jellemzői, de a valódi képet mind szerkezeti, mind energetikai oldalról több „tökéletlenség” is bonyolítja. A lánc töredezett, ha az egyes szomszédos elektronegatív atomok (általában O és N) a H-kötés távolságánál messzebb vannak. Ezen természetesen segíthet egyrészt a molekulamozgás, amely a láncot időlegesen folytonossá teszi, és ezalatt a nagysebességű PT végbemehet, másrészt a rendezett rendszerekre jellemző, csökkent dimenzionalitás, amely megnöveli annak lehetőségét, hogy „protonhuzalt” formáló H-híd lánc alakulhasson ki. Energetikai oldalról tekintve a legnagyobb nehézséget egyrészt a csökkenő hajtóerő (a proton donor-akceptor párok pK_a értékei eltérhetnek az optimálistól), másrészt a protonnak a H-híd láncba való belépéséhez szükséges energia jelenti. Természetesen a fehérje szerkezete olyan is lehetne, amelyben a fenti belépési energia minimális (ez valósul meg a K^+ és Cl^- ionok vezetésére szakosodott csatornafehérjékben), de ilyen protontranszportáló fehérjét még nem írtak le.

A másik gondolat, hogy a PT megértését segítheti, hogy léteznek olyan fehérjék, például a *gramicidin A*, illetve az *aquaporin*, amelyek kiválóan alkalmasak modellszámolásokra. A *gramicidin* a baktérium membránján keresztül csatornát alakít ki, amelyben a protonvezetés a vízmolekulák alkotta H-híd láncon keresztül alacsony energiával valósulhat meg. Az *aquaporin* membránfehérjében kialakult csatornák specifikusan vizet vezetnek, a PT-t pedig gátolják. A vezetési mechanizmusok értelmezésére egymással nehezen összeegyeztethető vélemények alakultak ki. A nagyon szerteágazó munkákból a molekuláris részletek elemzése nélkül annyi közös tapasztalat leszűrhető, hogy a PT kinetikai gátja alacsony, a proton kis aktiválási energiával mozoghat a láncon belül, és a belső helyek betöltöttségét a lapos energiaprofil elősegíti, a deszolvatáció pedig bünteti. A protonvezetés tényleges sebességét ezen energiájárlékok egymáshoz viszonyított aránya határozza meg.

A proton útja a bakteriális RC fehérjében

A fotoszintézisnek fényvel működtetett elsődleges folyamata a RC-hez kapcsolódó kinont (Q) két elektron és két proton felvételével kinollá (QH₂) redukálja. E folyamatban a PT jellemzőinek megállapítását nagyban nehezíti az a tény, hogy hozzá elektron transzfer (ET) is csatolódik, amelynek leválasztása speciális kísérleti feltételeket (mutáció, kémiai szubsztitúció, ligandumképzés stb.) igényel. A H⁺ ionnak nagy, 1,4 nm távolságot kell bejárnia, míg a vizes fázisból a fehérje belsejében (a Q_B kötőhelyre elrejtett Q-hoz ér. Útját az ionizálható aminosavak különlegesen sűrű hálózata jelöli ki. Szükség is van ilyen ösvényre, mert a Q_B hely pozitív elektrosztatikai potenciálja stabilizálja a szemikínon aniont (Q⁻), de nem kedvez az ide irányuló és fiziológiai szempontból hasonlóan fontos PT-nek. A H⁺ ionok irányítatlan mozgása tökéletlen mechanizmus lenne a kinon teljes redukálására.

Mindkét proton a két felszíni hisztidinnel (H126 és H128) és aszparaginsavval (H124) kijelölt kapun lép be, végigfut a közbülső savas oldalláncokon, majd a Q_B-hez közeli L213 aszparaginsavnál útjuk elágazik: az első az L223 szerinen át, míg a második az L212 glutaminsavon keresztül kerül a kinon C₁-O, illetve C₄-O karbonil oxigénjeihez (Paddock et al., 2003). Ezek az aminosavak azonban nem képeznek folytonos protonszállító útvonalat, mert közöttük jelentős szakadások vannak. Ezeket a fehérje oldalláncaitól és a vízmolekulák dinamikájától függően időlegesen vagy a fehérje redox-állapotától, szerkezetétől függően stabilan áthidalhatják vízmolekulák. A RC-n belüli proton útvonalra tehát nem remélhetünk egyértelmű választ a szerkezet finomabb (statikus) feloldásától, azt mindig kinetikai (a működésre vonatkozó) vizsgálatoknak kell kiegészíteniük.

Néhány szó a PT időskálájáról. Ha összefüggő a H-híd, és összetevői között páronként kedvező energetikai viszonyok alakulnak ki ($\Delta pK = pK_{\text{akceptor}} - pK_{\text{donor}} > 0$), akkor a PT nagyon gyors, sebessége akár 10^{12} s^{-1} is lehet. Az RC-ben a protonvezetési sebesség (10^7 s^{-1}) ugyan kisebb, de még így is igen nagy. Ennek oka, hogy noha a víznek nagyon erős a proton donor potenciálja ($pK_a \sim -2$) és a terminális akceptorok pK_a értékei nem alacsonyak ($pK_a(\text{L212Glu/L212Glu-H}) \sim 9$ és $pK_a(\text{Q}_B\text{H}^-/\text{Q}_B\text{H}_2) \sim 10,7$), (azaz jelentős a hajtóerő), a H-hidak láncolata csak rövid időre áll össze. Ha pillanatszerűen (fénygerjesztéssel) szemikínont (Q⁻) hozunk létre, a fehérje a protont a vizes fázisból csak jókora (0,1 ms) időkéssel veszi fel, mert meg kell várnia, hogy a fehérje (protonfelvételre) alkalmas konformációba kerüljön (Maróti – Wraight, 1997). A közismert mondást kissé átalakítva: nem akkor megyünk át a folyón, amikor odaérünk, hanem akkor, amikor a híd elkészül.

A protonok forrása

A fehérje protonvezetési csatornája három, egymástól független úton is kerülhetnek protonok a vizes fázisból: szabad H⁺ (hidroxónium, H₃O⁺) ionok diffúziójából, a víz protolíziséből és mozgékony puffer protonjának leadásából. Semleges vagy alkalikus pH tartományokban (pH > 7) a szabad H⁺ ion koncentráció ([H⁺] < 100 nM) a fehérje koncentrációjánál lényegesen kisebb lehet, és a protonfelvételt határoló tényezővé válhat. Ezt elkerülendő, három, egymással összefüggő mechanizmus (protonantenna, csökkenő helyi pH és protontartály) működésével bővíthet a protonok forrása.

Felületi protonálható csoportok érdekes mintázatát figyelték meg számos, protont transzportáló fehérjében (bakteriorodopszin, citokróm c, citokróm oxidáz), amelyekről feltételezhető, hogy a H⁺ ionokat (antenna módjára) hatékonyan begyűjtik az oldatból, és ugyancsak nagyon hatékony felületi vezetéssel a protoncsatorna nyílása felé továbbítják. A felületi vezetést az általában negatív töltésű membránfelületek kiterjeszthetik, illetve erősíthetik. Az elméleti és kísérleti munkák nehezen áttekinthetők, és nem vagyunk arról teljes mértékben meggyőződve, hogy az antenna-funkció minden közölt esetben valóban nagyobb protonfluxust eredményez. Bakteriorodopszinnál felületi karbonsavakat cseréltek ki nemprotonálható aminosavakra, de a fotociklus (protonpumpa) sebességében egyáltalán nem (vagy csak alig) figyeltek meg csökkenést (Lányi János személyes közlése).

A protoncsatorna nyílásánál a H^+ ion koncentráció az oldatbeli érték fölé növekedhet egyrészt a fehérje negatív felületi potenciálja, másrészt a közeli és így egymással erősen kölcsönható protonálható aminosavak pufferhatása miatt. A kölcsönhatás növeli, és egyben széthúzza az ilyen csoport effektív pK_a értékét. A nagyobb pK_a megnöveli a protonhozzáférhetőséget a protoncsatorna számára, azaz helyi protontartályként működik. A széthúzott pK_a tartomány (a RC H126, H128 és talán H68 hisztidinjeinél ez az érték 5,9-7,4) szélesebbé teszi azt a pH tartományt, ahol a csoport tagjai közül legalább az egyik protonált. Összefoglalásul megállapíthatjuk, hogy a protonok útja a fehérjék belsejébe a hidrogénhidak képlékeny, a molekula dinamikájával összhangban kialakuló rendszerén keresztül vezet. A protonvándorlás irányát és hajtóerejét a fehérje megfelelő csoportjának elektron(felhő)vel való redukálása (például citokróm oxidáz, SOD) vagy fénygerjesztése (ez látásnál a rodopszin, a fotoszintézisnél a klorofill) határozza meg. Hasonlóan ahhoz, mint ahogy az Úr Izrael fiait erős kézzel hozta ki Egyiptomból, és mutatott irányt a vándorlásuk alatt:

„Az Úr nappal felhőoszlopban haladt előttük, hogy mutassa az utat, éjjel pedig tűzoszlopban, hogy világítson nekik. Így éjjel-nappal vonulhattak.” (Biblia, Kivonulás könyve, 13, 21)

Kulcsszavak: *molekuláris biofizika, protontranszfer, protonpumpák, fotoszintézis, protonvezetés, fehérje, bakteriorodopszin, hidrogénhid*

IRODALOM

Biblia. Ószövetségi és Újszövetségi Szentírás (1976): Szent István Társulat, Budapest

Eigen, Manfred (1964): Proton Transfer, Acid-base Catalysis and Enzymatic Hydrolysis. *Angewandte Chemie – International Edition*. 3, 1–19.

Maróti Péter – Wraight, Colin A. (1997): Kinetics of H^+ ion Binding by the $P^+Q_A^-$ State of Bacterial Photosynthetic Reaction Centers: Rate Limitation within the Protein. *Biophysical Journal*. 73, 367–381.

Paddock, Mark L. – Feher, G. – Okamura, M.Y. (2003): Proton Transfer Pathways and Mechanism in Bacterial Reaction Centers. *FEBS Letters*. 555, 45–50.

Sass, Hans Jürgen – Büldt, G. – Gessenich, G. – Hehn, D. – Schlezinger, R. – Berendzen, J. – Ormos P. (2000): Essential Structural Alterations for Proton Translocation in the M State of Wild-type Bacteriorhodopsin. *Nature*. 406 649–653.