

XXXI. OTDK Biológia Szekció

Dobos András

IV. éves Biomérnök BSc

MTA SZBK Biofizikai Intézet
SZTE TTIK Biotechnológiai Tanszék

**Membrán kötött szulfid oxidáló enzimek tisztítása
egy fotoszintetikus bíbor kénbaktériumból**

Témavezetők:

Dr. Tóth András tudományos munkatárs

Dr. Rákhely Gábor egyetemi docens

2012



Tartalomjegyzék

1	Bevezető.....	4
1.1	Fotoszintetizáló baktériumok	6
1.2	Fototróf bíbor kénbaktériumok.....	6
1.3	Fotoszintetikus bíbor kénbaktériumok kénanyagcseréje.....	7
1.4	Szulfid kinon oxidoreduktáz	8
1.4.1	Bevezető	8
1.4.2	Szulfid kinon oxidoreduktázok általános felépítése	8
1.4.3	Szulfid kinon oxidoreduktázok működése	9
1.4.4	Szulfid kinon oxidoreduktázok csoportosítása	10
1.5	<i>Thiocapsa roseopersicina</i> BBS	12
1.5.1	A <i>Thiocapsa roseopersicina</i> ban található szulfid kinon oxidoreduktáz 1 (Sqr)	13
1.5.2	A <i>Thiocapsa roseopersicina</i> ban található szulfid kinon oxidoreduktáz 2 (Sqr)	13
2	Célkitűzés	15
3	Anyagok és módszerek.....	16
3.1	Felhasznált baktérium törzsek.....	16
3.2	Felhasznált Primerek:	17
3.3	Mikroorganizmusok tenyésztése.....	17
3.3.1	<i>Escherichia coli</i> törzsek növesztéséhez használt tápoldatok	17
3.3.2	<i>Thiocapsa roseopersicina</i> törzsek növesztéséhez használt tápoldatok.....	17
3.3.3	Növesztési körülmények <i>Escherichia coli</i> törzsekhez	17
3.3.4	Növesztési körülmények <i>Thiocapsa roseopersicina</i> törzsekhez	18
3.4	DNS-el kapcsolatos eljárások.....	18
3.4.1	<i>T. roseopersicina</i> kromoszómális DNS tisztítása	18
3.4.2	Plazmid tisztítása <i>E. coli</i> -ból.....	18
3.4.3	<i>T. roseopersicina</i> plazmid DNS izolálása	19
3.4.4	DNS szerkezet módosítások.....	19
3.4.5	Agaróz gélelektroforézis	20
3.4.6	DNS fragment izolálás agaróz gélből	20

3.4.7	Polimeráz láncreakció (PCR)	21
3.5	Baktériumok transzformációja	21
3.5.1	<i>E. coli</i> kompetens sejtek készítése.....	21
3.5.2	<i>E. coli</i> sejtek transzformálása	21
3.5.3	<i>T. roseopersicina</i> sejtek transzformálása konjugációval.....	21
3.6	Fehérje termeltetés és tisztítás	22
3.6.1	A fehérjetermelő sejt kultúrák feltárása	22
3.6.2	Szolubilis és membrán sejtfrakciók előállítása	23
3.6.3	Dializálás	23
3.6.4	Fehérje tisztítás affinitás kromatográfiával	23
3.6.5	Denatúráló poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE).....	23
3.7	Tisztított fehérjék vizsgálata.....	24
3.7.1	Fehérjemennyiség meghatározása Micro-Lowry technikával	24
3.7.2	Western Blot analízis	25
3.7.3	Fehérje abszorpciós spektrum meghatározása	25
4	Eredmények és értékelésük	26
4.1	A <i>Thiocapsa roseopersicina</i> Sqr és Sqn fehérjék termelését biztosító expressziós vektorok elkészítése	26
4.2	A <i>T. roseopersicina</i> Sqr és Sqn fehérjét termelő törzsek előállítása	28
4.3	<i>T. roseopersicina</i> törzsek rekombináns Sqr illetve Sqn fehérje termelési képességének vizsgálata	29
4.4	Rekombináns Sqn tisztítása FRNSQNN <i>T. roseopersicina</i> törzsből	31
5	Összefoglalás	38
6	Irodalomjegyzék	39
7	Köszönetnyilvánítás.....	44
	Nyilatkozat	45
	Rövidítés jegyzék.....	46

1 Bevezető

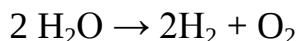
Az elmúlt évtizedekben világunk felgyorsult és így egyre inkább megnőtt az energiaigénye. A jelenkori erőforrásaink azonban leginkább nem megújuló erőforrásokon alapszanak, amelyek nem tartanak örökké, valamint túlnyomó többségüknek kitermelése, átalakítása, hasznosítása még környezetünket is szennyezi.

A jelenleg megtermelt energiáknak túlnyomó részét fosszilis energiahordozók elégetésével nyerjük. A fosszilis energiahordozók az elpusztult ősi fotoszintetizáló szervezetekből (mikroorganizmusok, növények) és az elpusztult heterotróf élőlényekből alakultak ki. A fotoszintetizáló organizmusok megkötik a légköri széndioxidot és a fény energiáját felhasználva magasabb energiájú szerves szénhidrogénekké alakítják azt. A heterotróf élőlények elfogyasztják a fotoszintetizáló szervezeteket, így azok szénhidrogén vegyületeit is, amikből saját felépítő folyamataikat működtetik. Később az elpusztult szervezetek az évmilliók alatt a föld felszíne alá süllyedtek, ahogy újabb és újabb föld és kőzetrétegek rétegződtek fölējük. Mélyen a föld alatt a nagy nyomás és magas hőmérséklet következtében ásványi energiahordozókká alakultak, mint a földgáz és kőszén és kőolaj. Ezeknek energiáját modern társadalmunk elégetés útján szabadítja fel, a bennük megkötött széndioxidot ismét a légkörbe juttatva. Így a CO₂ légköri koncentrációja növekszik tovább erősítve az üvegházhatást (a légköri CO₂ nem engedi a földfelszínről érkező infra sugárzást ki a világűrbe), ami globális fölmelegedéshez vezet, visszafordíthatatlan éghajlatváltozást okozva.

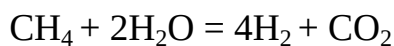
Mindezek miatt az emberiség egyik legfontosabb megoldandó problémájává vált a meg nem újuló energiahordozók helyettesítése megújuló energiahordozókkal. A XX. század nagy találmánya az atomenergia, ami ugyan nem megújuló, de megfelelően üzemeltetve környezetkímélőbb és nagyobb hatásfokú, viszont ehhez rengeteg tőkét kell befektetni. A megújuló energiaforrásainkon alapuló technológiák jelenleg kis hatásfokúak, drágák és nem állnak stabilan rendelkezésre (pl. szélenergia, napenergia).

Kiutat adhat egy olyan elem, aminek elégetésekor csak és kizárólag víz képződik. Ez az elem a jövő energiahordozójaként is nevezetes hidrogén. A hidrogén elemi állapotban ritkán fordul elő a természetben, így elő kell állítani. Erre kémiai, fizikai és biológiai

módszerek ismeretesek. A legelemibb fizikokémiai módszer az elektrolízis. Ezen technika hátulütője, hogy magas energiaigényét fosszilis energiahordozók elégetésével biztosítják.



Az egyik leggyakoribb kémiai módszer az úgynevezett szintézisgáz előállítása, ami a földgázból kinyert metánból és forró vízgőzből készül:



Ez az előállítási módszer sem teljesen „bio”, hiszen a víz felforralása is fosszilis energiahordozó használatát igényli, másrészt a hidrogént nem tiszta állapotában kapjuk meg és a tisztítás további energiát igényel.

Léteznek olyan mikroorganizmusok, amelyek képesek a biológiai úton megvalósítani a hidrogéntermelést hidrogenázaik és nitrogénázaik segítségével. A nitrogénázzal rendelkező mikroorganizmusok a levegőben lévő elemi nitrogént képesek megkötni, ammóniává redukálni, és a folyamat melléktermékeként hidrogén gázt termelnek (Benemann és mts., 1996). A biotechnológia, mint az egyik leggyorsabban fejlődő tudományág régóta foglalkozik a biohidrogén termeltetéssel. A kutatások célja, hogy ipari méretekben és gazdaságosan lehessen biológiai úton hidrogént előállítani.

Jelenleg a kutatások egyik centrumában a fotoszintetizáló baktériumokkal való hidrogén termelés megvalósítása áll. Ebben az esetben a hidrogén termeléshez szükséges magas energiájú elektronok forrásai lehetnek szervetlen vegyületek (pl. víz, redukált kénvegyületek) vagy szerves vegyületek, amelyek sok esetben a fotoszintézis során megkötött fényenergiával válnak alkalmassá a protonok redukálására. A fotoszintetizáló mikroorganizmusokkal történő hidrogén termelést fotobioreaktorokban viszonylag olcsón lehet megoldani, így hasznosítva a nap energiáját, viszont a hidrogén kinyerési hatékonyságuk még javítandó.

A Szegedi Tudományegyetem Biotechnológiai Tanszékén régóta vizsgált fototróf bíbor kénbaktérium a *Thiocapsa roseopersicina*, amely hidrogenázai illetve nitrogénáza révén képes biohidrogén termelésre. Ezen enzimek működéséről számos publikáció született, viszont a hidrogén anyagcseréhez szorosan, több úton kapcsolódó kénanyagcserében résztvevő enzimek ismerete még hiányos. A kénanyagcsere mélyrehatóbb megismerése és megértése lehetőséget teremt arra, hogy olyan baktérium törzseket állítsunk elő a jövőben, amelyek segítségével hatékony foto-biohidrogén termelő technológia valósítható meg.

1.1 Fotoszintetizáló baktériumok

A fototróf baktériumok legfontosabb közös tulajdonsága, hogy tetrapirel pigmentekkel és fotoszintetikus rendszerrel rendelkeznek. Ezekkel képesek fény jelenlétében lejátszódó elektron transzportok és egyéb energiaátalakítások végrehajtására. Csupán néhány baktériumcsoport képes ily módon energiát nyerni. A csoport tagjai közül az első a *Cianobaktériumok* családját foglalja magába, mely mikroroganizmusok klasszikus értelemben vett fotoszintézist végeznek, azaz víz molekulát használnak elektron donorként, miközben molekuláris oxigént állítanak elő. A második csoport a bíbor és zöld baktériumokat, valamint a *Heliobaktériumokat* tartalmazza. Ezen csoport tagjai nem molekuláris vizet használnak fel elektron donorként, hanem például redukált kén vegyületeket, szerves vegyületeket, elemi hidrogént vagy éppen vasat. A harmadik csoport az úgynevezett ABC (aerobic bacteriochlorophyll-containing) baktériumok, melynek tagjai kevésbé vizsgált Proteobaktériumok. Ami bizonyos, hogy képesek fotoszintetikus pigment-fehérje komplexeket képezni, mellyel fény függő elektron transzportot hajtanak végre. (Imhoff és mts., 2008)

1.2 Fototróf bíbor kénbaktériumok

A bíbor kénbaktériumok a Gammaproteobaktériumokhoz tartoznak. Növekedésük során képesek redukált szerves kénvegyületek elektron forrás gyanánt felhasználni (elemi ként, szulfidot, tioszulfátot). Rendelkeznek bakterioklorofil a-val és b-vel, fotoszintetikus rendszerük II. típusú és Calvin ciklus útján fixálják a CO₂-ot. A bíbor kénbaktériumok egyik családja a *Chromatiaceae* melynek tagjait két fő anyagcsere típusba lehet osztani: a változatos metabolizmussal rendelkezőkre és a specializált metabolizmussal rendelkezőkre.

A specializált metabolizmussal rendelkező fajok, mint például a *Allochrochromatium warmingii* szigorúan anaerob környezetet és fotoszintetikus körülményt igényel. Kizárólag szulfidot képes elektron donorként hasznosítani, tehát elemi hidrogént és tioszulfátot nem, valamint fotoszintézisében csakis ecetsavat és piroszőlősavat asszimilál CO₂ és szulfid jelenlétében.

Ezzel szemben a változatos metabolizmussal rendelkező fajok, mint például a *Allochrochromatium vinosum*, elektron donorként nemcsak elemi ként és szulfidot használ, hanem tioszulfátot is (Imhoff, 2005a). A legtöbb ide tartozó faj képes asszimilációs szulfát redukcióra, valamint képes növekedni heterotróf módon redukált kénvegyületek hiányában, míg azok jelenlétében kemolitotróf anyagcserét valósít meg (Gorlenko, 1974; Kämpf és Pfennig, 1980; Kondrat'eva és mts., 1976). Néhány faj még arra is képes, hogy

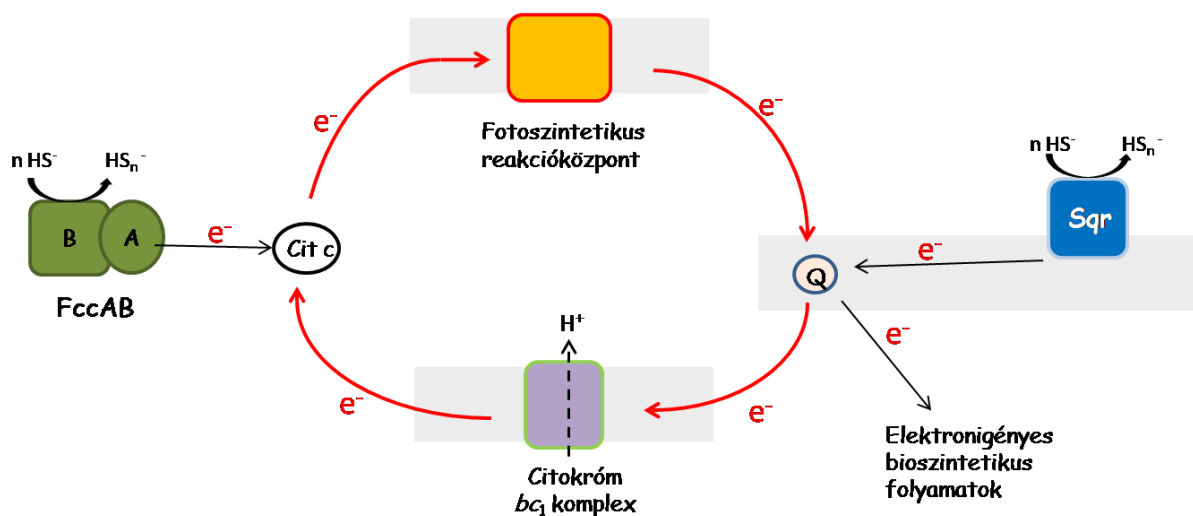
kemoorganotróf módon aerob környezetben növekedjen, de ebben az esetben szulfid vagy tioszulfát forrásra van szüksége, mert a szulfát asszimilációja represszáva van aerob körülmények között (Kondrat'eva és mts., 1981).

1.3 Fotoszintetikus elektronáramlás bíbor kénbaktériumokban

Ezen baktériumok növekedésük során a fotoszintézis folyamatában megkötött fényenergiával a II. típusú fotoszintetikus rendszerükön és citokróm bc_1 enzimkomplexükön keresztül folyó elektron áramlást tartanak fenn, amit arra használnak fel, hogy elektrokémiai grádiens hozzanak létre. A H^+ elektrokémiai grádiens energiáját többek közt a NAD^+ -nak az elektron áramlásból kicsatolódó elektronokkal való redukálásának lehetővé tételére használják fel. Az így elraktározott redukáló potenciált főként CO_2 megkötésére hasznosítják a sejtek.

A folyamatot részletesen kifejtve (1. ábra): A fotoszintetikus elektronáramlás hajtómotorja a fotoszintetikus reakcióközpont által felfogott fény. A fény által gerjesztett magasabb energiájú elektronok a fotoszintetikus reakcióközpontból a membrán kinon raktárba jutnak. A membrán kinon raktárból az elektronok a citokróm bc_1 komplexbe jutnak, miközben a citoplazmából protonok továbbítodnak a periplazmatikus állományba. A citokróm bc_1 komplexből az elektronok a periplazmában található citokróm c fehérjékre kerülnek, ami a felvett elektronját a fotoszintetikus reakcióközpontba továbbítja, amint az a fény hatására leadta a sajátját.

Ebből a körforgásból az elektron kiléphet a membrán kinon raktárból, hogy elektron igényes bioszintetikus folyamatokat működtessen. A kilépett elektronokat azonban pótolni kell, hogy a körfolyamat továbbra is működjön. Ehhez redukált vegyületeket kell oxidálni. A bíbor kénbaktériumokban csoportunk két olyan enzimtípust vizsgál, ami az elektron utánpótlásért felel szulfid oxidáció útján. A szulfid kinon oxidoreduktáz (Sqr) egy egy alegységes flavin tartalmú fehérje, míg a flavocitokróm c (Fcc) két alegységes (FccA (citokróm alegység) és FccB (flavin tartalmú alegység)) enzim. (Schütz és mts., 1997), (Brune, 1995b; Chen és mts., 1994; Kostanjevecki és mts., 2000; Meyer és Cusanovich, 2003).



1. ábra A bíbor kénbaktériumok szulfid oxidáló enzimei és anyagcsere kapcsolataik.
Sqr: szulfid kinon oxidoreduktáz; Fcc: flavocitokróm c; Cit c: c-típusú citokróm fehérje
Q: membrán kinon raktár

A szulfid kinon oxidoreduktáz a szulfidok oxidálásából felszabadult elektronokat közvetlenül a membrán kinon raktárába juttatja, miközben az oxidálódott kén atomokból poliszulfid láncokat képez. Ezzel szemben a flavocitokróm c a szulfid oxidálásából nyert elektronokat alacsonyabb energiaszinten a citokróm c fehérjéknek adja át.

1.4 Szulfid kinon oxidoreduktáz

1.4.1 Bevezető

A szulfid kinon oxidoreduktáz egy az élővilág szinte minden csoportjában (a növényvilág kivételével) előforduló FAD kofaktor tartalmú membrán kötött enzim. A különböző szulfid kinon oxidoreduktáz típusú fehérjéket 6 csoportba szokás felosztani, strukturális különbségeik alapján. Az összes Sqr típusra igaz, hogy a szubsztrátja redukált szulfid vegyület, amit oxidálni képes kinon redukálása közben. A típusokat jelenleg I.-től VI.-ig osztják fel (Marcia és mts., 2009).

1.4.2 Szulfid kinon oxidoreduktázok általános felépítése

A szulfid kinon oxidoreduktáz egy alegységes polipeptid, melynek egyetlen prosztatikus csoportja a FAD, melyet általában kovalensen köt. Tipikusan membrán kötött, annak külső oldalán elhelyezkedő fehérje. Nem rendelkezik semmiféle szignalizációval, így a sec függő, vagy attól független útvonalon való transzportálódása a citoplazmatikus membránon keresztül nem ismert. Rendelkezik viszont egy C terminális szakasszal, amit az irodalom interfész-domének (Argyrou és mts., 2004) nevez és valószínűleg a fehérje

transzlokációjában, ezáltal a fehérje sejten belüli elhelyezkedésének meghatározásában játszik szerepet (Schütz és mts., 1999; Marcia és mts., 2009). Az interfész-domén hossza és végső konformációja Sqr típusonként nagy változatosságot mutat.

Fontos említést tenni a FAD kötőhelyének közvetlen környezetéről is. A FAD-ot, a $N^1-C^2=O^2$ lókusznál egy dipólusos helix lánc, az N^5 -ös atomjához közel egy glutaminsav, míg a flavinjánál egy cisztenin köti (Heuts és mts., 2009). Ezen három kötésnek kell meglennie a FAD kovalens kötéséhez és aktivitásához, azonban a cisztein elhelyezkedése a polipeptid láncon változhat a különböző Sqr fehérjék esetén. Például az *Acidianus ambivalens*-ben található Sqr fehérjében a cisztein a 129-es pozícióban van és egy síkban helyezkedik el az izoalloxazin gyűrűvel ráadásul a dimetilbenzil oldalhoz közel. A cisztein S_γ atomja $1,53 \text{ \AA}$ távolságra van a FAD C8M pozíciójától, valamint a kovalens kötés nem okoz szterikus torzulást. Ezzel szemben az *Aquifex aeolicus* Sqr fehérjében a cisztein a 124-es pozícióban található, de a FAD C8M pozíciója és közte lévő távolság túl nagy a tioéter kötés létrehozásához, ezért egy plusz kén molekulára van szükség (Marcia és mts., 2009).

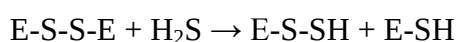
A fehérje rendelkezhet egy polipeptid lánc szakasszal, az ún. „sapka-hurokkal” aminek a feladata valószínűleg az, hogy a NAD(P)H elől lefedje az enzim aktív centrumát.

Kimutatták *A. ambivalens*-ben, hogy a 294-es pozícióban található valin kulcsfontosságú, mivel az enzim szulfid oxidációs affinitásért felelős. (Brito és mts., 2009)

1.4.3 Szulfid kinon oxidoreduktázok működése

Az Sqr működésére kidolgoztak egy modellt, melyben az enzim konzerváltan 156 és 347-es (*Rhodobacter capsulatus*-ban található Sqr, mint modell) pozíciójában található két, diszulfid híddal egymáshoz kapcsolódó ciszteinje az, ami alapvető fontossággal bír (Griesbeck és mts, 2000).

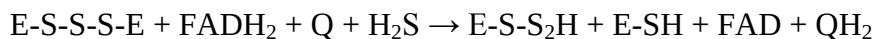
Első lépésben a szulfid jelenlétével felbontja a diszulfid hidat a két cisztein között és egy redukált valamint egy tiolcsoporthoz kötött cisztein keletkezik:



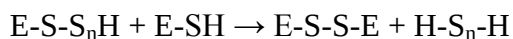
A következő lépésben a FAD redukálódik és triszulfid híd képződik a két cisztein közt:



A harmadik lépésben a flavinról az elektronok átkerülnek a kinonra, majd egy újabb szulfid molekula felbontja a triszulfid hidat és bekötődik:

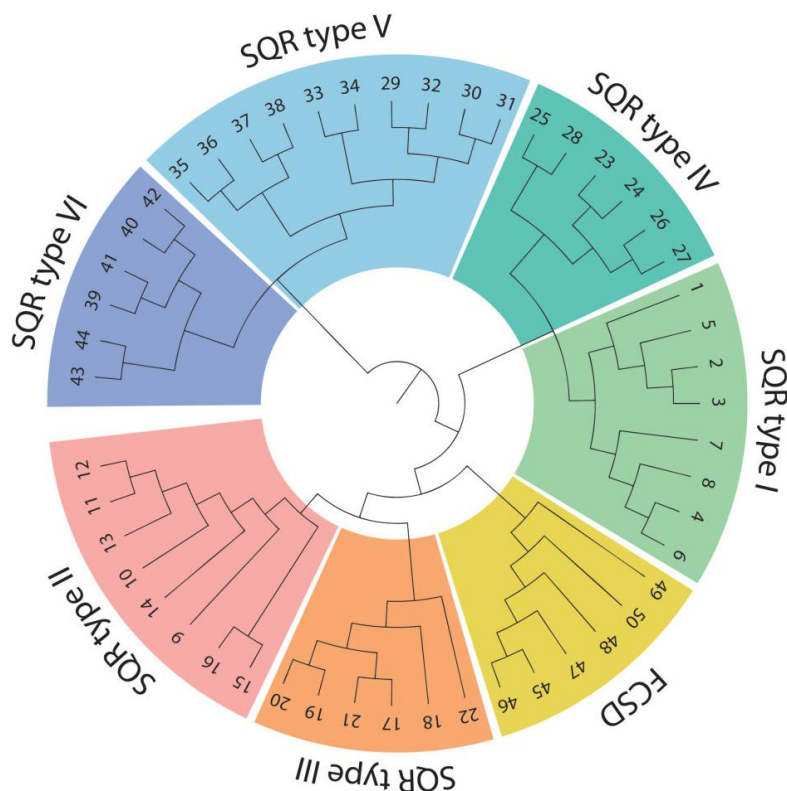


A második és harmadik lépések ciklikus egymásutánjának következtében egy poliszulfid lánc képződik, ami majd néhány ciklust követően leválik az enzimről, miközben helyreáll az első lépés előtti állapot:



1.4.4 Szulfid kinon oxidoreduktázok csoportosítása

Az Sqr enzimeket 6 filogenetikai csoportba osztották fel az évek alatt (2. ábra) (Marcia és mts., 2010). Ezen csoportok tagjait aminosav szekvencia analízissel vizsgálták és az alapján tudták megkülönböztetni. Főbb különbségeket a konzervált helyzetű aminosavak elhelyezkedése vagy éppen hiánya, másodlagos és harmadlagos térszerkezeti elemek megléte, elhelyezkedése, illetve hiánya adja.



2. ábra: Az SQR fehérjék filogenetikus fája. (forrás: Marcia és mts., 2010)

Az **I. típusba** tartozó SQR enzimek baktériumokban (*Aquificaceae*, α - és β *Proteobaktérium* és *Cianobaktérium*) találhatóak elsősorban, amelyek szulfid detoxifikáló funkciót töltenek be a sejtekben. Jellemző közös pontjaik, hogy 3 konzervált helyzetű

ciszteint (Cys124, Cys156 és Cys347 - *Aquifex aeolicus*) és „sapkázó-hurkot”(294-312 - *Aquifex aeolicus*) tartalmaznak, továbbá a C terminálison egy interfész domént, ami egy nyújtott hurokból és egy amfipatikus két-hélix motívumból áll.

A **II. típusba** tartozó Sqr enzimek baktériumokban (*Firmicutes* és *Proteobaktérium*) és eukarióta szervezetekben (élesztőgombák, férgek, rovarok és emlősök) találhatóak meg, de növényekben nem. Aktivitásuk van, de az csak mM-os koncentrációban jelen levő szulfid esetén mutatható ki (Shibata és mts., 2006, 2007 Vande és mts., 1999 Hildebrandt és mts., 2008, Theissen és mts., 2008). Az I. típusú Sqr-hez képest ennek az enzimsorozatnak az egyik ciszteinje helyett tirozinja van (Cys124, helyett Tyr124 - *Aquifex aeolicus*-hoz hasonlítva), így feltételezhető, hogy a FAD-ot 8- α -O-tirozil kötéssel köti (Emsley és mts., 2004). A csoport tagjainak az I. típusúhoz képest hiányzik a „sapkázó-hurkuk”, és nyújtott hurok képlettől mentes, kivéve az N-terminális szignál szekvenciát, ami az eukarióta fehérjék sajátja. Pontos szerepük nem ismert, de mivel a közelmúltban felfedezték a szulfid neurotranszmitter tulajdonságát, ez új irányt mutat a kutatásoknak.

A **III. típusú** Sqr a legkevésbé jellemzett enzimsorozat. Tagjai a zöld kénbaktériumokban (*Chlorobiaceae*) valamint az Archeákban találhatóak meg. Szintén nem rendelkeznek sapka-hurokkal, mint a II. típusú Sqr enzimek, de egymással nagyobb fokú hasonlóságot mutatnak, mint a II. típus enzimjeivel.

A **IV típusú** szulfid kinon oxidoreduktázok főleg zöld kénbaktériumokból (*Chlorobiaceae*) mutatható, ki de nem kizárólagosan, hiszen találtak egy homológot bíbor kénbaktériumban is (*Allochromatium vinosum*) (Reinartz és mts., 1998). A három szulfid kötésében fontos cisztein (Cys124, Cys156 és Cys347 - *Aquifex aeolicus*) az I. típusú Sqr csoportból konzervatív módon itt is jelen van. Továbbá a Val294 egy izoleucinra lett lecserélve, a Ser155 egy treoninra, valamint a Pro311 erősen konzervált helyzetű (*A. aeolicus*). Érdekessége, hogy öt darab hurok található rajta, amiből három az *Aquifex aeolicus*-ban található I. típusú Sqr fehérje kiterjesztett felszínstruktúrájával homológ, csak hosszabb, mint az. A másik kettő szintén a *Aquifex aeolicus* I. típusú Sqr-jével homológ „sapka-hurok”, csak hosszabb, illetve az interfész doménben található nyújtott hurok, ami viszont megegyező hosszúságú.

Az **V. típus** *Sulfolobales* és *Chlorobiaceae*-ből mutatható ki. Amikor korábban meghatározták ezt a csoportot, akkor csak az Archaeobaktériumok Sqr-jei tartoztak bele, de a nemrégiben az *A. vinosum* és az *A. ambivalens* egy-egy Sqr típusú fehérjét is ide sorolták (Brito és mts., 2009, Pham és mts., 2008). Itt is konzerváltak a kulcsfontosságú cisztein

helyek (Cys129, ami a FAD-ot kovalensen köti, illetve a Cys178 és Cys350 (*A. ambivalens*), amelyek diszulfid hidat képeznek egymás között), valamint erre a csoportra jellemző a 154. aminosavtól a 178.-ig (*A. ambivalens* I. típusba sorolható Sqr-je szerint számozva) elhelyezkedő nyújtott hurok, az I. típushoz képest rövidebb interfész domén. A kinon kötő helyüket kísérletesen nem állapították meg.

VI. típus: Régen be nem azonosított csoport volt (Pham és mts., 2008), olyan enzimekkel mint CT1087 a *Chlorobium tepidum*-ban és Aq_788 az *Aquifex aeolicus*-ban. Később a CT1087-ben be lett bizonyítva a szulfid függő kinon redukáló aktivitása így ezen fehérjéket mostmár aktivitásuk alapján is az SQR fehérjék családjába sorolják. (Chan és mts., 2009). Az I. típusú Sqr-hez hasonlóan ezekben is konzervált két cisztein helyzete (Cys124, a FAD-hoz való kötéshez, valamint Cys347 a szulfid oxidációban játszik szerepet). Azonban az I. típusban a 156-os pozícióban elhelyezkedő cisztein helyett metionin vagy valin található (*Aquifex aeolicus* I. típusú Sqr-je szerint nézve) (Marcia és mts., 2010).

1.5 *Thiocapsa roseopersicina* BBS

A tudományos diákköri munkám során a *Thiocapsa roseopersicina* fototróf bíbor kénbaktériummal dolgoztam. Ez egy Gram negatív *Chromatiaceae* családba tartozó mikroorganizmus (Bogorov és mts., 1974). Anaerob és aerob körülmények közt is képes növekedni, azonban csak anaerob körülmények között tud fotoszintetizálni. Változatos kénanyagcserével rendelkezik, elektron donorként redukált kénvegyületeket (tioszulfátot, elemi ként valamint szulfidot) használ fel (Visscher és mts., 1990, Le Faou és mts., 1990). A Fríz szigetek védett öbleinek alsóbb vízrétegeiből izolálták, amely állandóan változó élőhelyet jelentett számára, hőmérséklet, kén és oxigén koncentráció szempontjából (Visscher és mts., 1990). Laboratóriumban növesztve 25 - 29 °C az optimális hőmérséklete. Megvilágítás mellett táplemezen telepeket körülbelül 14 nap alatt képez, míg folyadékkultúrája 4 - 5 nap alatt éri el a maximális sejtsűrűséget. Genotípusától, valamint a tápoldat minőségétől függ, hogy a kultúra a rózsaszín milyen árnyalatával bír, melyet fotoszintetikus pigmentjei biztosítanak neki. A periplazmatikus térben felhalmozott kénglobulusai opálos kinézetet adnak neki. Fotoszintetikus rendszere hasonló, mint a többi fotoszintetizáló szervezeté, annyi különbséggel, hogy a II. fotoszintetikus rendszer hiányzik belőle, így nem képes vizet bontani és oxigént sem termel, viszont, ha oxigénhez jut, akkor képes heterotróf módon nőni.

A tioszulfátot szulfáttá és elemi kénné alakítását a periplazmatikus Sox enzimszisztéma katalizálja. A képződött elemi kén kénglobulusokat alkotva a periplazmában halmozódik fel.

1.5.1 A *Thiocapsa roseopersicina*ban található szulfid kinon oxidoreduktáz 1 (Sqr)

A *T. roseopersicina* Sqr fehérjéjének aminosav szekvencia vizsgálata alapján kiderült, hogy tartalmaz olyan konzervatív aminosavakat és régiókat, melyek FAD, kinon, és szulfid kötésére valamint szulfid függő kinon redukcióra tesz alkalmassá más fajokban talált hasonló enzimeket. Ez a fehérje az *Allochromatium vinosum*-al Sqr-jével 80%, míg a *Rhodobacter capsulatus*-al Sqr fehérjéjével 29% azonosságot mutat.

A laboratóriumban a korábbiakban a *T. roseopersicina* *sqr* gén által kódolt aminosav szekvenciából azonosításra került a FAD kötésére alkalmas hármass-régió motívum. Továbbá a *R. capsulatus* Sqr fehérjéjének feltételezett kinon kötő helyével, melynek központi eleme egy hisztidin (His131), megegyező szekvenciájú régiót 131-es pozíciójú hisztidin központosít.

Továbbá a C –terminális régióban elhelyezkedő aminosavak is nagyfokú hasonlóságot mutatnak a többi Sqr enzim C-terminális “interfész-doménjével”. Esetünkben ez 38 aminosavból áll. Feltételezhető, hogy ez is hasonlóan a fehérje sejten belüli elhelyezkedését hivatott biztosítani.

A *Thiocapsa roseopersicina* Sqr fehérjéje a IV. típusba tartozik, mert a 294-es pozíció közvetlen közelében nincs valin, viszont a 283 és 301 pozícióban található izoleucin, amelyek közül az egyik a valin funkcióját tölti be, továbbá a 311-es pozíció mellett Pro308 található, valamint a 155-ös pozícióban nincs szerotinin, de 143 és 166-os pozícióban is található a treonin.

1.5.2 A *Thiocapsa roseopersicina*ban található szulfid kinon oxidoreduktáz 2 (Sqn)

A *T. roseopersicina* genom szekvenciájának korábbi *in silico* vizsgálatoknál találtak egy nyitott leolvasási keretet, amelynek bioinformatikai vizsgálatával azt kapták, hogy a lehetséges terméke 26%-ban azonos a *T. roseopersicina* *sqr* gén termékével (3. ábra), továbbá 80%-ban azonos a *Allochromatium vinosum* *sqr* gén termékével, valamint 55%-ban a *Rhodobacter capsulatus* egy akkor még nem jellemzett szulfid kinon oxidoreduktáz típusú fehérjéjével. Ezek alapján a fehérje előzetesen a szulfid kinon oxidoreduktáz 2 (Sqn) nevet kapta.

Az Sqn fehérjében is azonosíthatóak a FAD kötő motívumok, melyek hasonlóak az Sqr enzimekéhez, viszont a kinon kötéséért felelős szekvencia mintázatok csak részlegesen találhatók meg, amelyek a központi hisztidint nem tartalmazzák. Az Sqn fehérjében az Sqr enzimek szulfid oxidációjában részt vevő két cisztein közül csak az egyik található meg

Mindez arra enged előzetesen következtetni, hogy az Sqn a szulfid kinon oxidoreduktáz típusú fehérjék VI. csoportjába tartozhat. (A IV. és I. típusú Sqr-ben konzervatívan meglévő Cys156 (*Aquifex aeolicus* Sqr-je I. típus) helyzetben Met156 található(3. ábra), ami a VI. csoportba tartozó Sqr fehérjék egy specifikumaként lett leírva (Marcia és mts., 2009).

3. ábra: *T. roseopersicina* Sqr és Sqn aminosav szekvenciájának összehasonlítása
C: szulfid kötésében szerepet játszó ciszteinek; **H**: kinon kötő régiók központi hisztidinjei;
 ----: FAD kötő motívumok; ~~~~: C-terminális régió

2 Célkitűzés

A Csoport célja a *Thiocapsa roseopersicina* fototróf bíbor kénbaktériumban található szulfid kinon oxidoreduktáz fehérjék vizsgálatára és jellemzése. A *T. roseopersicina* genom *in silico* analízisének alapján kettő szulfid kinon oxidoreduktáz típusú enzimet kódoló gén lett azonosítva: a szulfid kinon oxidoreduktáz 1 (*sqr*), valamint egy nyitott leolvasási keret, amelynek terméke az Sqr fehérjéhez mutatott nagyfokú hasonlósága miatt szulfid kinon reduktáz 2 (*sqn*) elnevezést kapta.

Az SzTE Biotechnológiai Tanszékén korábban végzetek kísérleteket, aminek célja az Sqr és Sqn fehérjék termeltetése *T. roseopersicina*-ban és aktív formában való kinyerése volt. Ezt C terminálison StrepII és Flag affinitás peptidekkel fuzionált Sqr és Sqn fehérje konstrukciókkal kívánták elérni. A kísérletekből kiderült, hogy az Sqr valószínűleg erősen membrán kötött fehérje, olyannyira, hogy nem is sikerült tisztítani. Ezzel szemben az Sqn valószínűleg gyengén membrán kötött, könnyen tisztítható fehérje. Azért, hogy mindkét enzim aktivitását vizsgálni lehessen, célul tűztem ki az Sqr és Sqn fehérjék N terminális végén Strep II affinitás peptiddel fuzionáltatott formában való termeltetését és tisztítását.

Célom eléréséhez első lépésként létre kellett hoznom olyan *T. roseopersicina* törzseket, amelyekben N-terminálison StrepII affinitás peptiddel fuzionált rekombináns Sqr és Sqn fehérjék expresszálnak. A törzsek enzimtermelő képességét sejtmembrán frakcióik szulfid függő kinon reduktáz aktivitás mérésével kívántam megvizsgálni, ellenőrizni.

Ezt követően az enzimek affinitás kromatográfiával történő nagy mennyiségű és további biokémiai vizsgálatokra alkalmas tisztaságú kinyerését tűztem ki célul. Ehhez a *T. roseopersicina* törzsek által megtermelt membrán kötött Sqr és Sqn fehérjéket a sejtmembrán minták szolubilizálásával oldható állapotúvá kellett alakítanom, amelyet detergenssek alkalmazásával terveztem megvalósítani.

3 Anyagok és módszerek

3.1 Felhasznált baktérium törzsek

Név	Genotípus	referencia
<i>E. coli</i> törzsek:		
S17-1 lambdapir	294 (<i>recA pro res mod</i>) Tp^rSm^r (pRP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7)	Herrero és mts., 1990
XL-1 Blue MRF ⁺	<i>recA1 gyrA96 (F'<i>lacI</i>^qZ)</i> Tc^r	Strategene
<i>T. roseopersicina</i> törzsek:		
BBS	vad típus	Bogorov és mts., 1974
HOQR	$\Delta hynSL, \Delta hupSL\Delta Sqr$	Rákhely és mts., személyes közlés
HOQN	$\Delta hynSL, \Delta hupSL\Delta Sqn$	Rákhely és mts., személyes közlés
FOQRON	$\Delta hynSL, \Delta hupSL$ $\Delta Fcc\Delta Sqr\Delta Sqn$	Rákhely és mts., személyes közlés
HOQRcompl	<i>HOQR + pDSQR</i>	Rákhely és mts., személyes közlés
HOQNcompl	<i>HOQN + pDSQN</i>	Rákhely és mts., személyes közlés
RSQRN	<i>HOQR + pDSQRNS</i>	ez a munka
NSQNN	<i>HOQN + pDSQNNS</i>	ez a munka
FRNSQNN	<i>FOQRON + pDSQNNS</i>	ez a munka

1. táblázat: Munkám során felhasznált mikroorganizmus törzsek és tulajdonságaik

3.2 Felhasznált Primerek:

Név	Szekvencia
OSQR21	5'- CATATGGCCAGCTGGAGCCATCCGCAGTTCGAGAA GATCGAGGGCCGCGCACGAATCCTTATCCTCGGAG-3'
OSQR22	5'- GAATTCTCAATCGGGCAGCATCGACCAAC-3'
OSQN11	5'-CATATGGCCAGCTGGAGCCATCCGCAGTTCGAGAA GATCGAGGGCCGCCATCGCATCACCATCGTCGGTTC-3'
OSQN12	5'-CTAGCGGTAGGGGCGCAGATACCAC -3'

2. táblázat: Munkám során felhasznált primerek és szekvenciájuk

3.3 Mikroorganizmusok tenyésztése

3.3.1 *Eschericia coli* törzsek növesztéséhez használt tápoldatok

Luria-Bertani (LB) tápoldat: 1000 ml oldathoz: 10 g tripton, 5 g élesztő kivonat, 10 g NaCl

LB táplemez: LB tápoldat + 1,5 % agar

SOC (SOB + Mg²⁺): 1000 ml tápoldathoz: 20 g tripton, 5 g élesztő kivonat, 0.5 g NaCl + 10 mM MgSO₄

3.3.2 *Thiocapsa roseopersicina* törzsek növesztéséhez használt tápoldatok

Pfennig féle tépoldat(PC): 1 literben: 20 g NaCl, 1 g KH₂PO₄, 1 g MgCl₂, 1 g KCl, 1 g NH₄Cl, 2 g NaHCO₃, 2 g Na₂S₂O₃, 200 µl B12 vitamin (100 / ml), 1 ml Fe-EDTA, 1 ml mikroelem oldat.

Mikroelem oldat: 2975 mg Na₂ - EDTA, 300 mg H₃BO₄, 200 mg CaCl₂ 6H₂O, 100 mg ZnSO₄ 7H₂O, 30 mg MnCl₂ 4H₂O, 30 mg Na₂MoO₄ 2H₂O, 20 mg NiCl₂ 6H₂O, 10 mg CuCl₂ 2H₂O, 1000 ml vízben (Pfennig és Trupper, 1992).

Antibiotikumokat a következő koncentrációkban alkalmaztam a tápoldatokban: streptomycin: 25µg/ml; kanamicin: 25µg/ml; gentamicin: 25µg/ml.

3.3.3 Növesztési körülmények *Escherichia coli* törzsekhez

Az *E. coli* törzseket az adott kísérletnek megfelelő ideig és a kellő hőmérsékleten LB tápoldatban folyamatos rázatás közben növesztettem vattadugóval lezárva Erlenmeyer lombikban (Ausubel és mtsai., 1996).

Az ampicillin antibiotikumot 100 µg / ml koncentrációban alkalmaztam a tápoldatokban.

3.3.4 Növesztési körülmények *Thiocapsa roseopersicina* törzsekhez

A *T. roseopersicina* törzseket csiszolt dugós Erlenmeyer lombikban, mikroaerob körülmények között 25 - 28°C inkubációs hőmérsékleten, folyamatos megvilágítás mellett, Pfennig féle tápoldatban (PC) növesztettem 5 - 6 napig.

3.4 DNS-el kapcsolatos eljárások

3.4.1 *T. roseopersicina* kromoszómális DNS tisztítása

A genomiális DNS tisztításhoz csiszolt dugós Erlenmeyer lombikba 60ml, antibiotikummal kiegészített PC tápoldatba oltottam le a megfelelő *T. roseopersicina* baktérium törzset és 5 - 6 napig folyamatos megvilágítás mellett 25 - 28°C-on növesztettem őket. A felnőtt kultúrából „Gene Elute” genomi DNS izoláló kit (Sigma, kat.sz.: KT2110-KT1) segítségével tisztítottam kromoszómális DNS-t. Az 1,5 ml kultúra sejtjeit centrifugálással (2 perc, 14000g) gyűjtöttem össze. Ehhez 180 µl lízis T puffert és 20 µl RNáz oldatot mértem hozzá és ezt 2 percig inkubáltam. Ezután 20 µl proteináz K oldatot adtam a mintához, majd pipettával szuszpendáltam az elegyet. Ezt követően a mintát 30 percig 55°C-on inkubáltam. Az idő leteltével 200 µl lízis C puffert adtam a rendszerhez és összekevertem, majd újabb 10 percig 55°C-on inkubáltam. A feltáródott sejtekhez 200 µl 97% koncentrációjú etanolt adtam, majd az elegyet az előkészítő pufferrel előkezelt oszlopra töltöttem és centrifugáltam (1 perc, 6500g). Az oszloptöltetet kétszer mostam 500 - 500 µl S1 mosó pufferrel, amit több centrifugálási lépéssel távolítottam el (1 perc, 6500g). Az oszlopra felkötődött genomi DNS-t 200 µl elúciós pufferrel (10 mM Tris – HCl, 0,5 mM EDTA, pH = 9,0) oldottam le. Az összes minta visszanyeréséhez kétszer centrifugáltam az oszlopot (1 perc, 6500g).

3.4.2 Plazmid DNS tisztítása *E. coli*-ből

A plazmid DNS tisztításához 30 ml 100 µg/ml ampicillin antibiotikumot tartalmazó LB tápoldatba oltottam le a megfelelő törzsből, amit aztán 37°C-on egy éjjelen át növesztettem. A felnőtt kultúrából „Gene Elute” plazmid DNS izoláló kit (Sigma) segítségével tisztítottam DNS-t. 4,5 ml kultúra sejtjeit centrifugálással (1 perc 8000 rpm) gyűjtöttem össze. Ehhez 200 µl RNáz-t tartalmazó reszuszendáló oldatban pipettával szuszpendáltam a sejteket. A felvett sejtekhez 200 µl lízis puffert adtam és kézi forgatással elegyítettem, majd az elegyet szobahőmérsékleten inkubáltam 5 percen át. Ezt követően

350 µl neutralizáló puffert adtam a feltárt sejtekhez, melyeket 10 percig jégen inkubáltam, majd centrifugáltam (10 perc 13000 rpm). Az oszlopot 500 µl oszlop előkészítő pufferrel kezeltem, majd ezt az oldatot centrifugálással eltávolítottam (1 perc 13000 rpm). A feltárt sejtek centrifugálását követő felülúszójából 750 µl-t az oszlopra töltöttem és centrifugáltam (1 perc 13000 rpm). Az oszloptöltetet kétszer mostam 750 µl mosó pufferrel. Majd a mosó puffer eltávolítása céljából újra centrifugáltam.

Az oszlopra felkötött plazmid DNS-t 23 µl ultratiszta ioncserélt vízzel eluáltam és centrifugálás (1 perc, 13000 rpm) útján gyűjtöttem össze.

3.4.3 *T. roseopersicina* plazmid DNS izolálása

Plazmid izoláláshoz a megfelelő *T. roseopersicina* törzset 25 - 28°C-on folyamatos megvilágítás mellett, csiszolt dugós Erlenmeyer lombikban, 60 ml PC tápoldatban növesztettem 5 - 6 napig. A felnőtt kultúrából a Plazmid tisztítás *E. coli*-ból című fejezetben (3.4.2) leírt technikával izoláltam plazmid DNS-t.

3.4.4 DNS szerkezet módosítások

3.4.4.1 Emésztés restrikciós endonukleázokkal

Fermentas cégtől származó restrikciós endonukleáz enzimekkel végeztem a restrikciós emésztéseket az enzimek gyártó által ajánlott pufferében, az eredeti gyártói útmutató szerint.

3.4.4.2 DNS végek tompítása T4 polimerázzal és Klenow-polimerázzal

A 3' túlnyúló egyesszálú DNS végek emésztéséhez a DNS fragmenteket T4 polimeráz enzimmal (Fermentas) T4 polimeráz 1 x pufferben, 0,2 mM dNTP jelenlétében 30 percen át inkubáltam.

Az 5' túlnyúló egyesszálú DNS fragment végeket Klenow-polimerázzal (Fermentas), 1 x Klenow polimeráz pufferben, 0,2 mM dNTP mellett 37°C-on, 1 órás reakcióval töltöttem fel.

3.4.4.3 Polinukleotid kináz kezelés

A DNS molekulák 5' végi foszforilálását polinukleotid kináz enzimmal (Fermentas) végeztem el, 1 x polinukleotid kináz puffer A-ban, 5–10 mM rATP és 0,1 mg/ml BSA mellett, 1 órás 37°C-os inkubálás során.

3.4.4.4 Alkalikus foszfatáz kezelés

A DNS fragmentumok 5' végén lévő foszfát csoportok eltávolítására alkalikus foszfatáz enzimet használtam (calf intestine alkaline phosphatase (CIAP), Fermentas). A reakciókat általában az enzim gyártója által biztosított pufferben végeztem, 37°C-on 30 percen át.

3.4.4.5 Ligálás

A ligálandó DNS fragmentumot általában 2 – 10-szeres mennyiségi feleslegben adtam a vektor DNS fragmenthez. Legtöbb esetben 0.5 - 2 U T4 DNS ligáz enzimet (Fermentas) alkalmaztam T4 DNS ligáz pufferben, 0,5 - 1 mM rATP mellett 10 - 16°C hőmérsékleten 1 - 16 órán át végezve a reakciót.

3.4.5 Agaróz gélelektroforézis

DNS molekulák analitikai és preparatív célokból végzett gélelektroforéziseihez 0.5 µg / ml EtBr-ot tartalmazó 1 % agaróz gélrt használtam. 1 x TAE (0,004 M Tris-acetát, 0,001 M EDTA) puffer rendszert használva, 90 V futtatási feszültséggel választottam el a különböző méretű DNS szakaszokat (Ausubel és mts., 1996).

3.4.6 DNS fragment izolálás agaróz gélből

DNS fragmentek agaróz gélből történő kivonásához a Silica Bead DNA Gel Extraction Kit (Fermentas, # K0513) rendszert használtam fel. Preparatív agaróz gélelektroforézis után a kívánt DNS fragmentet tartalmazó gél darabot steril pengével vágtam ki és egy 1,5 ml-es centrifugacsőbe helyeztem. A kivágott gél szelethez 600 µl NaI oldatot adtam és az agaróz oldódásáig 55°C-on rázattam. 5 µl szilikaport adtam az oldathoz és 5 percig 55°C-on inkubáltam, pár percenként felrázva. Egy perces centrifugálás (13000 rpm) után az üledéket átmostam 500 µl mosó pufferrel, majd újra centrifugáltam (1 perc, 13000 rpm). A mosást még kétszer megismétltem, majd az utolsó centrifugálás után az üledéket szobahőmérsékleten szárítottam. Ezután a szilikaporra 20 µl desztillált vizet mértem és 65°C-os termosztátban rázattam 10 percig a DNS fragmentek feloldása céljából. Legvégül a szuszpenziót addig centrifugáltam (13000 rpm), míg szilikamentes felülúszót nem kaptam. Az izolált DNS mintát a felhasználásig -20°C - on tároltam.

3.4.7 Polimeráz láncreakció (PCR)

Általában 50 µl végtérfogatban végeztem a reakciót. A reakcióelegyek templátként plazmid DNS-t, genomi DNS-t vagy baktérium kolóniák felszuszpendált sejtjeit tartalmazták, valamint 1 - 1 pmol / µl koncentrációjú primereket, 10 µM dNTP-t, 1x DNS polimeráz puffert (Finnzymes) és 1 U DyNAZyme DNS polimerázt (Finnzymes). Eppendorf típusú PCR készülékben hajtottam végre a reakciókat, az alábbi lépéseket tartalmazó program szerint: 1,5 perc 95°C-os denaturációt követte a primer-templát hibridizációja 68°C-on 1,5 percig, majd ezt követően 1,5 perc DNS szintézis lépést iktattam be 72°C hőmérsékleten. A fenti lépéseket 30-szor ismételtam. Azokban az esetekben, amikor a klónozáshoz szükséges fragmentumokat állítottam elő, Pfu enzimet (Fermentas) használtam.

3.5 Baktériumok transzformációja

3.5.1 *E. coli* kompetens sejtek készítése

Az XL1-Blue MRF' valamint S17-1 lambda-pir *E. coli* törzsek sejtjeit 22°C-on 60ml SOB tápoldatban növesztettem (Sambrook és mts., 1989) ($OD_{600}=0,4$), majd 10 percen át jégen hűtöttem azután lecentrifugáltam (10 perc, 2500g, 4°C). Az összegyűjtött sejteket jégen tartva 16 ml TB (10 nM Pipes, 55 mM $MnCl_2$, 15 mM CaCl, 250 mM KCl, pH = 6,7) pufferben felszuszpendáltam, majd ismételten lecentrifugáltam.

A leülepedett sejteket 4 ml TB pufferben felszuszpendáltam, majd 300 µl DMSO-t adtam a rendszerhez, amelyet ezután 10 percig jégen inkubáltam. Majd jégen előhűtött eppendorf csövekbe 100 - 100 µl térfogatonként szétosztottam a szuszpenziót és folyékony nitrogénben lefagyasztottam a kompetens sejteket. Azokat -80°C-on tároltam további felhasználásig (Inoue és mts., 1990).

3.5.2 *E. coli* sejtek transzformálása

A transzformálandó DNS-t 100 µl kompetens sejthez adtam, amit ezután 30 percre jégre raktam. Ezt követően hősokknak vetettem alá a mintát (42°C, 50 mp), majd 900 µl SOB oldatot valamint 20 µl 20%-os glükóz oldatot adtam az elegyhez. Ezt 37°C-on 1 órán keresztül rázattam. Végezetül a megfelelő antibiotikummal kiegészített táplemezre szélesztettem a transzformált sejteket.

3.5.3 *T. roseopersicina* sejtek transzformálása konjugációval

A *T. roseopersicina* sejtekbe a plazmid DNS molekulákat konjugációval juttattam be. Ehhez a recipiens *T. roseopersicina* törzsek sejtjeit 28°C-on, a transzformálni kívánt

plazmidokat tartalmazó donor S17-1 lambda-pir *E.coli* sejteket 37°C-on, a törzsnek megfelelő antibiotikum jelenlétében, $OD_{650} = 1,8$ illetve $OD_{600} = 0,6$ értékig növesztettem, majd a sejteket centrifugálással összegyűjtöttem. A sejteket kétszer 4 - 4ml steril *T. roseopersicina* sóoldattal (összetétele 1000 ml térfogatra számolva: 20 g NaCl, 1 g KH_2PO_4 , 1 g $MgCl_2$, 1 g KCl) mostam, majd a harmadik centrifugálás után 100 -100 μ l *T. roseopersicina* sóoldatban szuszpendáltam fel. A felszuszpendált *E. coli* és *T. roesopersicina* sejteket egy közös 1,5 ml térfogatú centrifugacsőbe mértem és összekevertem. Az így létrejött sejtkeveréket egy konjugációs táplemezre (18 g/l NaCl, 1 g/l KH_2PO_4 , 1 g/l $MgCl_2$, 1 g/l KCl, 1 g/l NH_4Cl , 2 g/l $NaHCO_3$, 2 g/l Na-acetát, 2 g/l $Na_2S_2O_3$, 2 g NB (Nutrient Broth, Difco), 1,5 % agar, 20 μ l B12 (1000 μ g / ml) csöppentettem, majd beszárítottam (Pfennig és mts. 1992). A táplemezeket egy éjszakán keresztül levegőn és fényen 28°C-on inkubáltam. Ezután steril fogpiszkálóval felkapartam a lemezen lévő sejteket és 500 μ l sóoldattal felszuszpendáltam, majd ebből a sejtsuszpenzióból 10x-es hígítási sort készítettem, amelynek minden tagjából 100 μ l-t antibiotikumos szelekciós táplemezre (PC + 2 g / l ecetsav + 25 μ g / ml kanamicin) szélesztettem. Az elkészült lemezeket Oxoid anaerogen (kat.szám: AN0025A) anaerobizáló rendszerrel végeztem oxigéntől mentes anaerob dobozban fényen 14 napon át inkubáltam 28°C-os inkubátorban.

3.6 Fehérje termeltetés és tisztítás

3.6.1 A fehérjetermelő sejt kultúrák feltárása

A fehérjetermelő *T. roseopersicina* törzsek sejtjeit szonikálással tártam fel. Ehhez 500 ml illetve 1500 ml *T. roseopersicina* sejt kultúrát növesztettem. Ezen sejteket centrifugálással gyűjtöttem össze (7000 rpm, 10 perc), majd 6 ml TBS pufferben (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl pH = 8,0) szuszpendáltam fel. A sejtsuszpenziókat jégen tartottam a szonikálással történő sejt feltárásig. A szonikálást Bandelin Sonoplus típusú szonikátorral végeztem MS/72 (*E.coli*) valamint VS/70T (*T.roseopersicina*) szonikáló fejekkel. A szonikálások 3 perc 20 másodpercig tartott (8 egymást követő 15mp hosszúságú szonikálási ciklus). A szonikálást követően a sejttörmeléseket, egész sejteket és a kénglobulusokat centrifugálással (20 perc, 22600g, 4°C) távolítottam el. A centrifugálásból származó felülúszó frakciót használtam a fehérjetisztítás további menete során.

3.6.2 Szolubilis és membrán sejtfrakciók előállítása

A szonikálással nyert sejt extraktumot Sorvall WX Ultra Series 90 típusú ultracentrifugával centrifugáltam (rotor:T-1270; 4°C, 53000g, 1,5 óra). Az ultracentrifugálás után keletkezett felülúszó a sejtek szolubilis frakciója, míg a képződött pellet a membrán sejtfrakció. A membrán frakciót 6 ml TBS pufferben szuszpendáltam fel. A felhasználásig -20°C-on tároltam.

3.6.3 Dializálás

A minták detergens koncentrációjának csökkentését dializáló cellulóz membrán (Sigma # D9777) alkalmazásával végeztem. A membránt ultratiszta ioncserélt vízben fél óráig előkezeltem. A detergenssel kezelt membrán frakció ultracentrifuga felülúszóját a dializáló membránba töltöttem, külső pufferként TBS oldatot használtam. A dializálás egy éjszakán keresztül 4°C hőmérsékleten folyt.

3.6.4 Fehérje tisztítás affinitás kromatográfiával

A célfehérjét tartalmazó sejtfrakciót (detergenssel oldott membránfrakció) affinitás oszlopkromatográfiával tisztítottam. A tisztításnak kellő mennyiségű oszloptöltetet (Strep-tactin sepharose szuszpenzió, IBA) egy gravitációs átfolyó oszlopra töltöttem, majd azt követően TBS mosó pufferrel átmostam. A célfehérjét tartalmazó sejtfrakciót az oszloptöltettel együtt 1 órán át folyamatos forgatás mellett szobahőmérsékleten inkubáltam. Később az átfolyó frakció lecsöpögtetése után kilenc lépésben (0. mosás + 1 - 8.mosás) kétszeres oszloptöltet térfogatú mosó pufferrel mostam az oszlopot. Majd négy lépésben fél oszloptöltetnyi térfogatú elúciós pufferrel (100 mM Tris-HCl pH = 8,0, 150 mM NaCl, 2,5 mM desztbiotin) eluáltam az oszlopra felkötött fehérjéket. Ezt követően 1 oszloptérfogatnyi TBS mosópufferrel lemostam az oszlopban maradt elúciós puffert, majd regeneráló oldattal kezeltem az oszlopot (100mM Tris-HCL pH = 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM hidroxí-azofenil-benzoidsav (HABA)).

3.6.5 Denaturáló poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE)

A fehérjetisztítások során előállított fehérjeminták méret szerinti eloszlását nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE) módszerrel végeztem. (Sambrook és mts., 1989) 1,5 mm vastagságú 10% töménységű denaturáló poliakrilamid géleket készítettem amelyeket Tris-glicin-SDS puffer elegyben futtattam. Az alsó, szeparáló gél összetétele: 1,9 ml H₂O, 1,7 ml 30 % akrilamid - bisz akrilamid (29:1) keverék, 1,3 ml 1,5 M Tris-HCl puffer (pH = 8,8), 0,05 ml 10% SDS, 0,05 ml 10% ammónium

perszulfát, 0,003 ml TEMED. A felső, gyűjtő gél összetétele: 2,1 ml H₂O, 0,5 ml 30% akrilamid - biszakrilamid (29:1) keverék, 0,38 ml 1,0 M Tris-HCl (pH = 6,8), 0,03 ml 10% SDS, 0,03 ml 10% ammónium perszulfát, 0,003 ml TEMED.

A megfelelő mennyiségű fehérje mintákat 1 x SDS felvivő pufferrel összekeverve, 15 percig 95°C hőmérsékleten végzett hőkezelés után a géltre töltöttem. A poliakrilamid gélek futtatása TGS (Tris-glicin-SDS) pufferben (25 mM Tris, 192 mM glicin, 0,1 % SDS pH = 8,3) történt, kezdetben 60 V feszültséget, majd a fehérje mintáknak az elválasztó gélbe történő érkezését követően 120 V állandó feszültséget alkalmazva.

A futást követően 1 órán keresztül kezeltem a gél fixáló oldatban a fehérjék helyhez kötése érdekében (30% etanol, 10% ecetsav). A fixáló oldatot desztillált vízzel való mosással távolítottam el a gélből teljes mértékben, majd Coomassie blue festékkel (1 literre számolva: 250 ml H₂O, 117,64 ml 85 % foszforsav, 100 g ammónium szulfát, 1,2 g Coomassie blue G250, 200 ml metanol) festettem egy éjszakán keresztül a gél. Végül 1 % ecetsavval mostam ki a felesleges festéket a jelek láthatóságának növelése érdekében.

3.7 Tisztított fehérjék vizsgálata

3.7.1 Fehérjemennyiség meghatározása Micro-Lowry technikával

A rekombináns fehérjét tartalmazó membrán frakció minták összfehérje koncentrációját 0 µg/µl, 5 µg/µl, 10 µg/µl, 25 µg/µl és 50 µg/µl koncentrációjú borjú szérumban albumin (BSA) oldatsor segítségével készített kalibrációs egyenes használatával határoztam meg.

Az ismeretlen koncentrációjú illetve a kalibrációhoz szükséges BSA mintákat 100 µl végtérfogatra egészítettem ki ultratiszta ioncserélt vízzel, majd 800 µl 0,25 M nátrium-hidroxid oldatot adtam hozzá. 20 percig tartó szobahőmérsékleten történő inkubálást után 300 µl C reagenst (A reagens [6% nátrium-karbonát] + B reagens [1,5% réz-szulfát, 3% nátrium-citrát] 1:50 arány) mértem az elegyekhez, majd újabb 15 perces szobahőmérsékleten való inkubálást követően 100 µl D reagenssel (72% Folin-reagens) egészítettem ki. 30 perc után megmértem az oldat 750 nm-en mutatott fényelnyelését 1 cm fényúttal rendelkező műanyag küvetában BIO-RAD SmartSmec Plus típusú spektrofotométer segítségével (Yeang és mts., 1998).

3.7.2 Western Blot analízis

A sejtfrakció mintákban található fehérjéket SDS-PAGE módszerrel választottam el 10% töménységű poliakrilamid gélben (futtatási körülmények: 30 perc, 60 V / 1 óra, 120V), majd nitrocellulóz membránra (Amersham™ Hybond™ -ECL) blottoltam Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (BIO-RAD) készülék segítségével (45 perc, 25 mV; 1 l transzfer puffer: 48 mM TRIS, 39 mM glicin, 20% metanol, 1,3 mM SDS; pH = 9,2). A membránt ezután 1 órán keresztül blokkoló oldattal (1% alacsony zsírtartalmú tejpor feloldva PBS-T pufferben (500 ml: 115 mM NaCl, 4 mM KH₂PO₄, 16 mM Na₂HPO₄, 0,1% Tween 20, pH = 7,5) kezeltem, ezzel megakadályozva a nem-specifikus fehérjék kötődését. Jelölési lépésben StrepMAB-Classic-HRP (IBA #2-1509-001) ellenanyagot használtam 1:10000-es arányban. A detektálás során a nitrocellulóz membránt 1 percig inkubáltam az Enhancer reagens és hidrogén peroxid 3 ml térfogatú 1:1 keverési arányú elegyével (Pierce, SuperSignal West Pico Rabbit IgG Detection Kit), majd a kemilumineszcens jelet digitális fotókamera segítségével detektáltam VersaDoc 4000MP (BIO-RAD) típusú dokumentációs rendszer segítségével.

3.7.3 Fehérje abszorpciós spektrum meghatározása

A tisztított fehérje minták abszorpciós spektrumjait Nicolet Evolution 300 típusú spektrofotométerrel végeztem. A fehérjékből 400µ-t 1cm fényúttal bíró kvarcüveg küvettákba mértem, majd a minták fényelnyelő képességét általában a 250 - 850 nm hullámhossz tartományban határoztam meg. A mérési ciklusokat többször megismételtem és az eredményeket átlagoltam.

4 Eredmények és értékelésük

4.1 A *Thiocapsa roseopersicina* Sqr és Sqn fehérjék termelését biztosító expressziós vektorok elkészítése

A *T. roseopersicina*-ban azonosított feltételezhetően szulfid oxidációs folyamatokban szerepet játszó szulfid kinon oxidoreduktáz 1 és szulfid kinon oxidoreduktáz 2 enzimek részletes biokémiai jellemzéséhez tisztított fehérjékre van szükség. A vizsgálandó Sqr és Sqn fehérjék StrepII affinitás peptiddel fuzionáltatott változatainak megfelelő *T. roseopersicina* törzsekben való termeltetése után azok tisztítását affinitás kromatográfiával terveztem megvalósítani.

Ennek érdekében el kellett készítenem azokat expressziós vektorokat, amelyek az Sqr illetve az Sqn fehérje N terminálison Strep II affinitás peptiddel fuzionáltatott rekombináns variánsainak kifejeződését képesek *T. roseopersicina*-ban biztosítani.

Az expressziós vektorok elkészítésének első lépéseként a *T. roseopersicina* genomjában azonosított *sqr* gént az OSQR21 és OSQR22, az *sqn* gént az OSQN11 és OSQN12 primer párok segítségével, tisztított kromoszómális DNS templátról induló Pfu polimeráz enzimet használó PCR felsokszorozással állítottam elő. A PCR termékeket 5' végeiken foszforiláltam T4 polinukleotid kináz alkalmazásával. Az így kapott DNS szakaszokat egy EcoRV restrikciós enzimmal hasított és az önligálódás elkerülése végett alkalikus foszfatázzal kezelt pBluescript vektorba építettem be. Ligálást követően az elegyeket betranszformáltam *E. coli* XL1-Blue kompetens sejtekbe, amelyeket IPTG-t, X-gal-t és ampicillint tartalmazó LB táplemezre szélesztettem ki. A másnapra felnövő telepek közül a fehér kolóniákat választottam ki, mivel az ezeket alkotó sejtek olyan plazmidokat hordoztak, amelyek tartalmazták az *sqr*, illetve az *sqn* géneket (pBSQRNS és pBSQNNS).

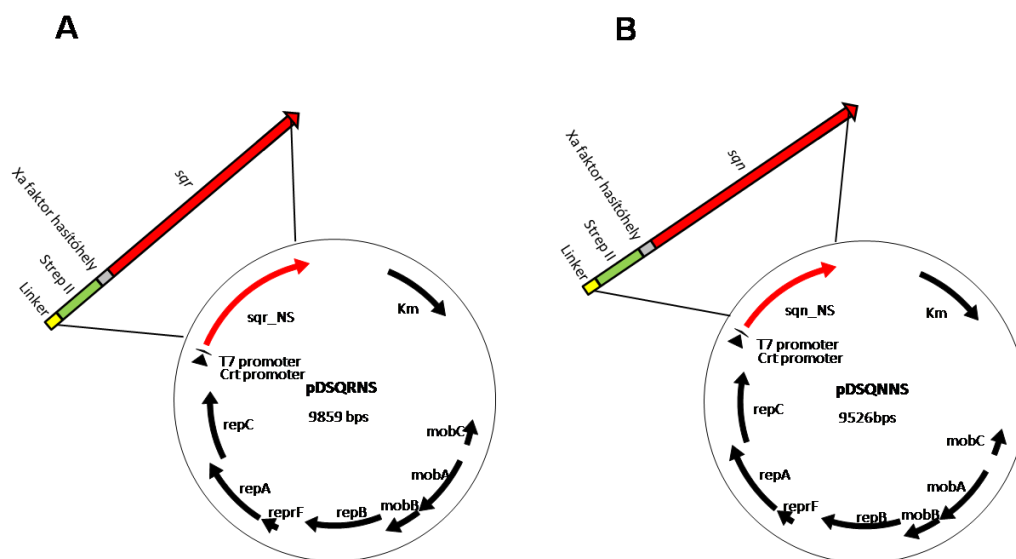
A következő lépésként a célfehérjéket kódoló DNS fragmenteket a pDSK6CrtKm expressziós vektorba építettem be oly módon, hogy a StrepII affinitás peptidet kódoló DNS szakasz után következő Sqr, illetve Sqn fehérje kódoló DNS szakaszok leolvasási kerete ne sérüljön. A pDSK6CrtKm vektoron található replikációs origónak köszönhetően az elkészített expressziós vektor képes stabilan fennmaradni *T. roseopersicina* és *E. coli* sejtekben is. A vektorba épített génektől 5' irányban Crt promóter és T7 promóter található. Ezen promóterek

az expressziós konstrukciókban *T. roseopersicina*-ban és *E. coli*-ban is képesek biztosítani az őket követő gének kifejeződését (Balogh Tímea személyes közlése).

A pBSQRNS plazmidokat NdeI és EcoRI restrikciós endonukleázokkal hasítottam, majd az emésztési termék agaróz gélen való futtatása utáni fragmentizálással nyertem ki a géneket hordozó DNS szakaszokat. Ezzel párhuzamosan a pDSK6CrtKm vektort is NdeI és EcoRV enzimekkel emésztettem, majd szintén fragmentizálással kinyertem a vektor nagyobb méretű fragmentjét, amelyet ligálással egyesítettem az Sqr-t kódoló DNS fragmenttel.

A következő lépésben a pDSK6CrtKm vektorba építtem be az *sqr* illetve *sqn* gént. Az elkészített expressziós vektorokba épített gének előtt Crt promóter helyezkedik el, amely biztosítja a tőle 3' irányban elhelyezkedő gének kifejeződését *T. roseopersicina*-ban. Az elkészített konstrukciók biztosítják, hogy az általuk termeltetni kívánt Sqr és Sqn fehérjék N-terminális végéhez StrepII affinitás peptid legyen fúzionáltatva.

A következőkben az *sqn* gént tartalmazó pBSQNNS vektort HindIII endonukleázzal hasítottam, hogy az *sqn* gént hordozó DNS szakaszt szeapárljam a vektortól. Az így kapott ragadós végeket Klenow enzimmal tompa végekké alakítottam, végül NdeI restrikciós endonukleázzal kezeltem a vektort. Fragmentizálással nyertem ki az *sqn* gént tartalmazó DNS szakaszt, amit PstI enzimmal kezelt és T4 DNS polimeráz enzim használatával tompa végűvé tett, majd NdeI restrikciós enzimmal meghasított pDSK6CrtKm expressziós vektor nagyobb fragmentjével egyesítettem. A ligálást követően kialakult termékeket ebben az esetben is transzformálással juttattam be *E. coli* XL1-Blue sejtekbe, amelyeket közül a rekombináns vektorokat hordozó transzformánsokat IPTG-t, X-gal-t és kanamicint tartalmazó LB táplemezeken szelektáltam, amit az tett lehetővé, hogy csak vektort tartalmazó baktériumok képesek felnőni a kanamicin rezisztencia miatt és azon belül az *sqr* illetve *sqn* gént tartalmazó telepek fehér színűek, míg ezeket a szakaszokat nem tartalmazó vektorokat hordozó baktériumtelepek kék színűek. A fehér telepeket kiválogatva megkaptam a pDSQRNS és a pDSQNNS expressziós vektorokat (4. ábra) tartalmazó *E. coli* törzseket. Ezek sejtjeiből izolált expressziós vektor plazmid DNS-ek szekvenálásával ellenőriztem a konstrukció készítés folyamatának a terveknek megfelelő végbemenetelét.



4. ábra: Az Sqr fehérje (pDSQRNS) (A), illetve az Sqn fehérje (pDSQNNNS) (B) kifejeztetését biztosító expressziós vektorok vázlatos szerkezete.

4.2 A *T. roseopersicina* Sqr és Sqn fehérjét termelő törzsek előállítása

Az SzTE Biotechnológiai Tanszékén korábban már készült három olyan deléciós mutáns *T. roseopersicina* törzs amely nem tartalmazza az *sqr* gént (HOQR), az *sqn* gént (HOQN), valamint sem az *sqr* és sem az *sqn* gént (FOQRON). Ezekre azért volt szükség, hogy előállíthassák azokat a törzseket, amelyek termelik az Sqr illetve Sqn fehérjét C terminálison affinitás peptiddel fúzionáltatva viszont a vad típusú variánst nem. Ezek a mutáns törzsek ugyanúgy alkalmasak voltak arra, hogy olyan törzseket hozzak létre belőlük amelyek ugyancsak Sqr illetve Sqn fehérjét expresszálnak N terminálisan affinitás StrepII peptiddel fúzionáltatva, míg a fehérjék vad variánsát nem fejezik ki.

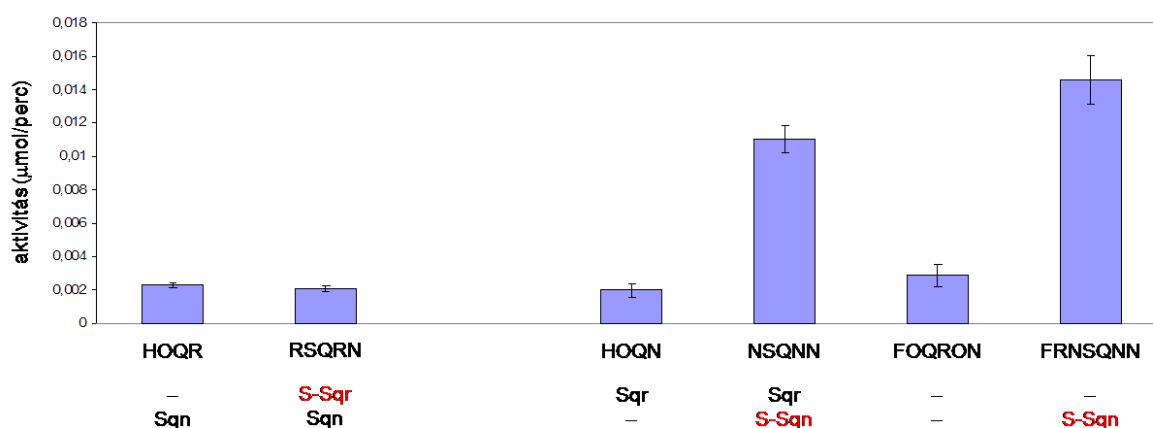
A törzsek előállításához az előzőekben elkészített expressziós vektorokat (pDSQRNS, pDSQNNNS) *E. coli* S17 konjugációt elősegítő törzsbe transzformáltam. Ezt követően az *E. coli* sejtvonalak segítségével az adott vektor DNS molekulákat a megfelelő – a célfehérje vad típusú változatát nem hordozó – *T. roseopersicina* törzsekbe konjugációval jutattam be.

A HOQR törzsbe a pDSQRNS, míg a HOQN és FOQRON törzsekbe pDSQNNNS vektort bejuttatva létrehoztam sorrendben az RSQRN, NSQNN illetve FRNSQNN expressziós *T. roseopersicina* törzseket.

4.3 *T. roseopersicina* törzsek aktív rekombináns Sqr illetve Sqn fehérje termelési képességének vizsgálata

Az irodalomból ismert, hogy a membrán kötött szulfid kinon oxidoreduktázok szulfid függő kinon redukciót katalizálnak, ezért membrán frakciót készítettem az Sqr illetve Sqn enzimek expresszálsa céljából létrehozott törzsekből, hogy megvizsgáljam azok szulfid függő durokinon redukáló képességét. A törzsek sejt kultúráiból kinyert membrán frakciók összfehérje tartalmát Micro-Lowry módszerrel mértem meg annak érdekében, hogy az aktivitás mérési reakcióelegyekben azonos összfehérje tartalmú membrán frakció minták legyenek bemérve. A membrán frakciókon szulfid függő durokinon redukáló aktivitást mértem *in vitro* reakcióelegyekben, hogy megtudjam a törzsek képesek-e, és ha igen milyen mértékben, aktív Sqr illetve Sqn fehérjét termelni.

Először rekombináns Sqr fehérje termelése céljából készített törzs (RSQRN) aktivitását vizsgáltam összevetve az Sqr mutáns kiindulási törzs (HOQR) aktivitásával (5. ábra).

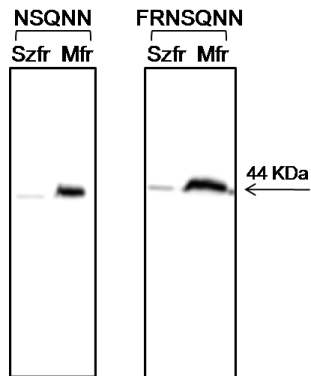


5. ábra: : Az Sqr és Sqn fehérje termelő *T. roseopersicina* törzsek membrán frakcióinak szulfid függő durokinon redukáló aktivitása.

A meghatározott reakciósebességekből azt a következtetést vontam le, hogy az RSQRN (N-terminálison affinitás peptidekkel kiegészített Sqr) törzs nem termel aktív Sqr fehérjét, mivel aktivitása megegyezik a kontrollként használt Sqr enzimben mutáns HOQR törzs membrán frakciójának szulfid függő durokinon redukáló aktivitásával. Az RSQRN törzs membrán illetve citoplazma frakciójával készült Western analízis (ábrát nem mellékeltem) kimutatta, hogy a sejtben nem található StrepII affinitás peptid, amire az arra specifikus antitest kötődhetne. A sikertelen Sqr expresszió okának kiderítése a jövőbeli tervek közt szerepel.

Továbbiakban a rekombináns Sqn fehérje termelése céljából készített törzsek (NSQNN illetve FRNSQNN) szulfid függő durokinon redukáló aktivitását vizsgáltam és hasonlítottam össze (5. ábra).

Ezen kísérlet során kontrolként az Sqn fehérjében mutáns HOQN, illetve mindhárom szulfid oxidáz enzimben mutáns FOQRON törzseket alkalmaztam. Az esetükben mérhető aktivitás értékekhez viszonyítottam a szulfid kinon oxidoreduktáz 2 enzimet expresszáló törzsekből készült membrán frakciók aktivitásait. Az NSQNN (N-terminálison affinitás peptiddel kiegészített Sqn) aktivitása, kontrollhoz (HOQN és FOQRON törzs) képest nagyobb, valamint az FRNSQNN törzs aktivitása az NSQNN törzs aktivitását is meghaladja. Tehát mindkét általam elkészített *T. roseopersicina* törzs membránjában található olyan fehérje, ami a szulfid függő kinon oxidációt képes katalizálni. Ezen törzsek fehérje termelését Western analízissel is ellenőriztem (6. ábra). Ez igazolta, hogy a törzsek sejtjeiben valóban megjelennek olyan rekombináns Sqn fehérjék, amelyek StrepII affinitás peptiddel vannak fúzionáltatva. Ezen fehérjék az előzetes feltételezéseinknek megfelelően a sejtek membránjához kötődnek.

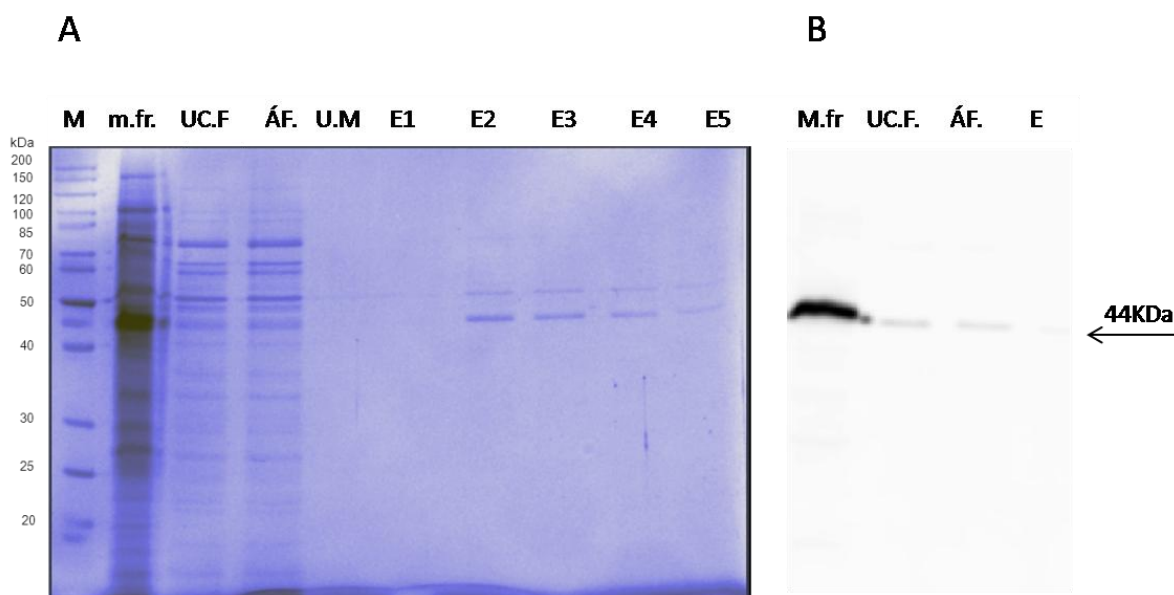


6. ábra: NSQNN és FRNSQNN *T. roseopersicina* törzsek rekombináns Sqn fehérjére specifikus ellenanyaggal végzett Western analízise. Szfr: szolubilis frakció; Mfr: membrán frakció.

Az Sqn fehérjét expresszálni képes törzsek közül a nagyobb szulfid függő kinon redukáló aktivitást az FRNSQNN membrán frakció mutatott. Továbbá ezzel összhangban a Western analízis is ennek a törzsnek a membrán frakciójában mutatott ki nagyobb mennyiségű Sqn fehérjét, így a továbbiakban az Sqn tisztítását az FRNSQNN törzsből kíséreltem meg.

4.4 Rekombináns Sqn tisztítása FRNSQNN *T. roseopersicina* törzsből

Csoportunkban korábban egy olyan törzsből végeztek Sqn tisztítási kísérleteket ahol a fehérje C terminálisan volt StrepII és Flag affinitás peptiddel fúzionáltatva. Ezen munkák eredményéből kiderült, hogy a *T. roseopersicina*-ban expresszálandó Sqn egy membránkötött, de a sejtmembránhoz csak gyengén kötődő fehérje, mivel nagyon alacsony koncentrációban alkalmazott nem-ionos detergens ($10^{-5}\%$ -os N-dodecil- β -D-maltozid (DDM)) segítségével is leválasztható a membránról. Ennek tudatában FRNSQNN törzsből származó, $10^{-5}\%$ -os DDM detergensevel kezelt, majd ultracentrifugált membrán frakció felülúszójából kíséreltem meg a fehérje tisztítását. A tisztítás során gyűjtött elúciós frakciók fehérjetartalmát SDS-PAGE módszerrel megvizsgálva látható, hogy az Sqn nagyon kis mennyiségben tisztult (7. ábra). Ennek oka lehet, hogy ebben a koncentrációban alkalmazott detergens nem volt képes a fehérje membránról való leválasztására, ezt a fehérje termelő sejtek feldolgozásának különböző lépéseiben gyűjtött minták Western analízise is alátámasztotta (7. ábra). A membrán frakcióban nagy mennyiségű rekombináns Sqn volt kimutatható, viszont a DDM-el kezelt membrán frakció ultracentrifugált felülúszójában már számottevően kevesebb fehérje volt jelen. Tehát a sejtek által termelt, az affinitás peptiddel az N terminálisan fúzionáltatott Sqn fehérjét az alkalmazott módszerrel nem sikerült a sejtmembránról leválasztani és szolubilizálni.



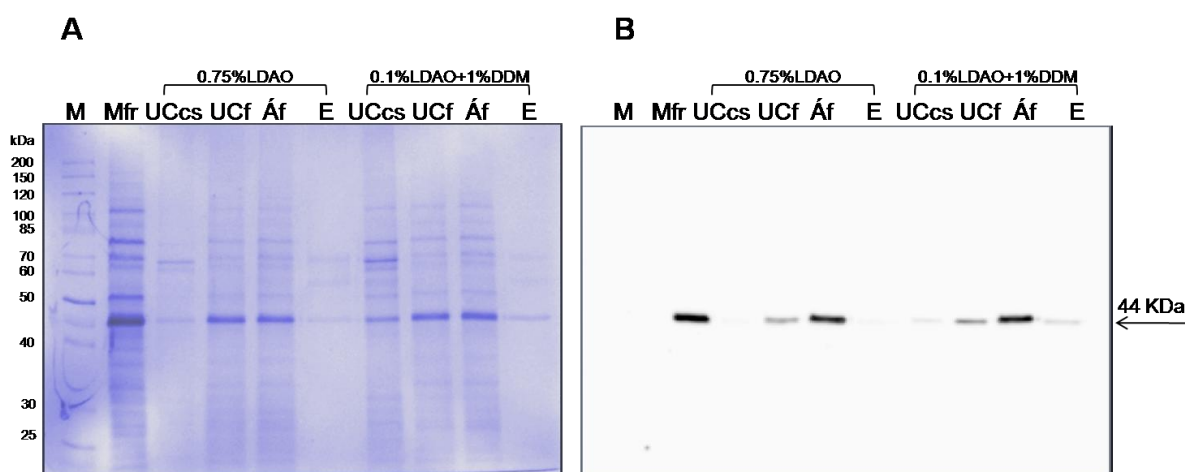
7. ábra: Sqn fehérje tisztítása affinitás kromatográfiával $10^{-5}\%$ -os DDM-el kezelt FRNSQNN membrán frakció ultracentrifugálási felülúszójából (A), illetve a sejtminták Western blot analízise (B). M: marker; Mfr: membrán frakció; Szfr: szolubilis frakció; Ucf: ultracentrifugálás után keletkezett felülúszó; Áf: affinitás kromatográfiás oszlop átfolyó frakció; M8: végső mosó frakció; E1-5: elúciós frakciók.

Ezt követően az Sqn sejtmembránból való felszabadításának elérése céljából a DDM-et magasabb koncentrációban egy membrán komplexek tisztítására alkalmas ikerionos detergenssel, az N,N-Dimetildodecylamin-N-oxiddal (LDAO) együtt alkalmaztam, illetve megvizsgáltam az önmagában alkalmazott LDAO hatását a fehérje tisztíthatóságára. A Csoporton belül korábban már alkalmazott detergens koncentrációkat választottam kiindulásnak (0,75% LDAO valamint 0,1% LDAO + 1% DDM). Ezen módszerekkel kezelt membrán mintákból az Sqn fehérje tisztítását szintén affinitás kromatográfiával kíséreltem meg (8. ábra/A). A sejtmembránok kezelésének különböző szakaszaiból származó minták rekombináns Sqn tartalmát ebben az esetben is Western analízissel vizsgáltam meg (8. ábra/B).

A 0,75% koncentrációban alkalmazott LDAO kezelés utáni sejtmembrán felülúszóban nagyobb mennyiségű Sqn fehérje volt jelen, de ennek ellenére a fehérjét még mindig csak elenyésző mennyiségben sikerült tisztítani, amiből arra következtettem, hogy az affinitás peptid nem volt képes felkötődni az affinitás kromatográfiás oszlopra, nagy mennyiségű fehérje az átfolyó frakcióban maradt.

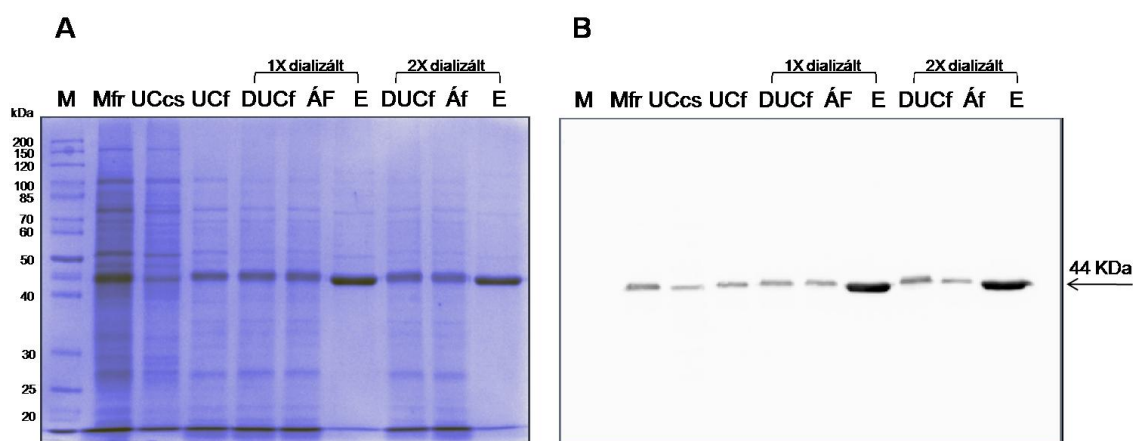
A 0,1 % LDAO +1% DDM detergens keverék alkalmazása javított a szolubilis fehérjék mennyiségén, de a korábbi kísérletekhez hasonlóan az elúciós frakcióban alig jelent meg az Sqn (8. ábra/A). Ezen tisztítások Western analízise is igazolta, hogy az enzim nagy része nem kötődött az affinitás oszlopra, átfolyt rajta (8. ábra/B)

Ennek oka lehet, hogy a detergens gátolja az oszlopra való felkötődést.



8. ábra: Sqn fehérje tisztítása affinitás kromatográfiával 0,75%-os LDAO-val és 0,1% LDAO + 1%-os DDM-el kezelt FRNSQNN membrán frakciók ultracentrifugálással előállított felülúszó mintájából (A), illetve a kísérlet során gyűjtött minták Western analízise (B). M: maker; Mfr: membrán frakció; UCcs: ultracentrifugálás után keletkezett csapadék; UCf: ultracentrifugálás után keletkezett felülúszó; Áf: átfolyó frakció; E: elúciós frakció.

A jobbik eredményt adó 0,1% LDAO + 1% DDM koncentrációjú kezelést egy dializálási lépéssel egészítettem ki, a fehérjékhez nem kötődött detergensnek mennyiségének csökkentése céljából. Erre azért van szükség, mert valószínűsíthető, hogy a detergens jelenlétével megakadályozta, hogy az affinitás peptid felkötődjön az oszlopra. A kezelt membrán frakciót két részre osztom. Az egyik mintát egyszer a másikat egymás után kétszer dializáltam, annak a kérdésnek megválaszolására, hogy ennek van-e hatása a tisztított Sqn fehérje mennyiségére illetve tisztaságára. A dializálás mértéke nem, viszont a dializálás alkalmazása számottevően növelte az affinitás kromatográfiával tisztítható enzim mennyiségét, igazolva a feltételezésemet, miszerint a detergens gátolhatja a fehérje oszlopra való kötődését (9. ábra/A). Ezt bizonyítja a rekombináns Sqn fehérjével szemben specifikus Western analízis eredménye is (9. ábra/B9. ábra). További fehérje tisztítási kísérletek során mindig dializáltam a kezelt membrán frakciók ultracentrifugálással előállított felülúszóját.

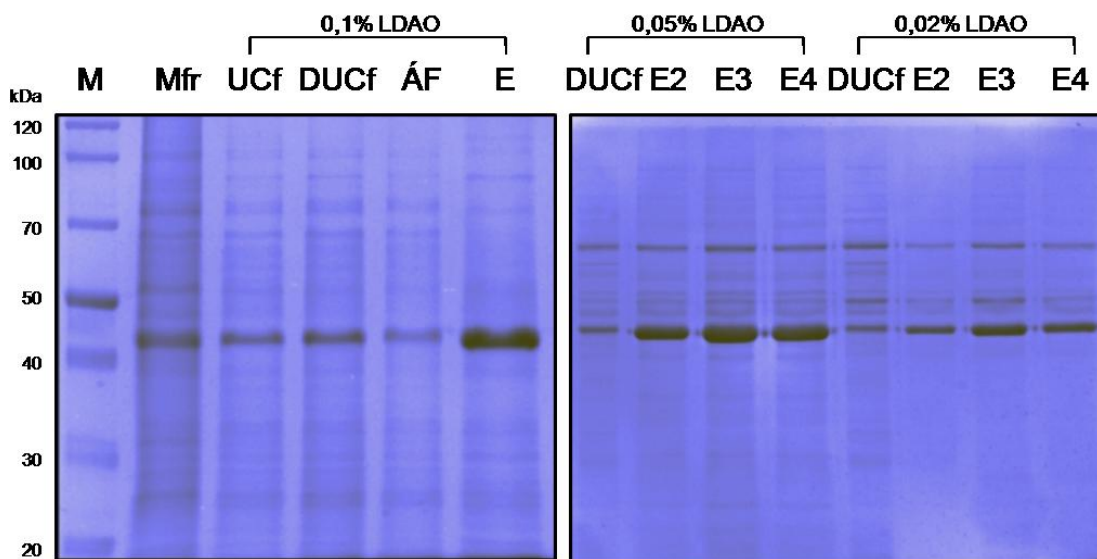


9. ábra: Sqn fehérje tisztítása affinitás kromatográfiával 0,1% LDAO + 1% DDM-el kezelt és dializált FRNSQNN membrán frakció ultracentrifuga felülúszójából (A), illetve a minták Western analízise (B). M: maker; Mfr: membrán frakció; UCcs: ultracentrifugálás után keletkezett csapadék; UCf: ultracentrifugálás után keletkezett felülúszó; DUCf: ultracentrifugálás után keletkezett dializált felülúszó; Áf: átfolyó frakció; E: elúciós frakció.

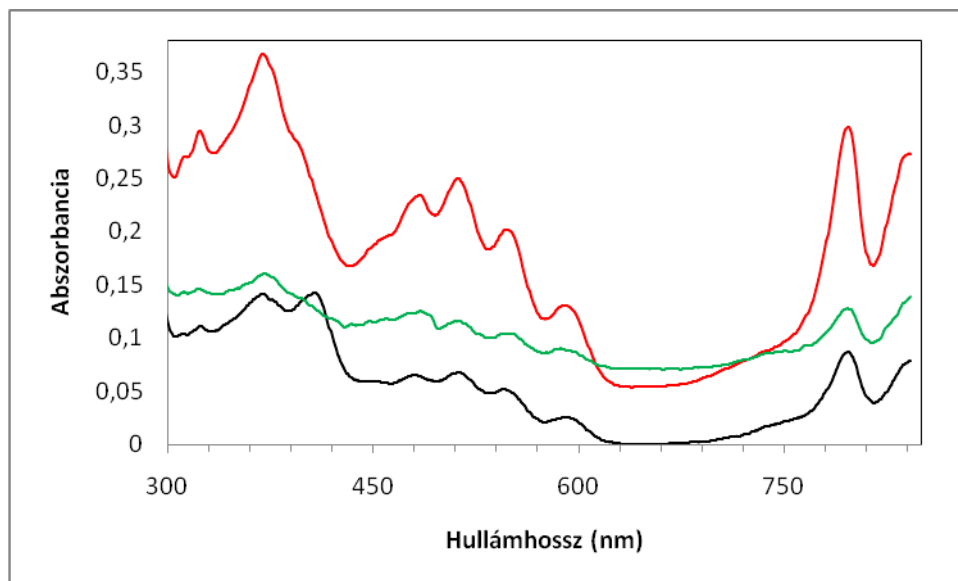
Miután az LDAO a fehérje szolubilizálást tekintve jó detergensnek bizonyult, következő lépésként megvizsgáltam, hogy mi az a legkisebb koncentráció, amely még képes a fehérjéket leválasztani a membránról, erre azért volt szükség, mert alapvető célom az, hogy lehetőleg minél kevesebb detergens legyen a rendszerben, mert annak jelenléte befolyásolhatja a kinyert fehérje aktivitását, hamis adatokhoz vezethet. A legalacsonyabb, Sqn fehérjéket még hatásosan szolubilizáló LDAO koncentráció 0,02% volt, viszont a tisztítható

fehérje mennyiségét tekintve a 0,05% koncentrációjú LDAO alkalmazása volt a leghatásosabb.(11. ábra).

A fehérjetisztítás eredményeként kapott elúciós frakciók abszorpciós spektrumát megvizsgálva az abban megjelenő csúcsok arra utaltak, hogy a tisztított enzim mellett fehérje és fotoszintetikus pigment szennyezést okozó membrán darabok vannak, amelyek elfedik a feltételezéseink szerint flavin tartalmú Sqn fehérje kofaktor tartalmát igazoló 450 nm hullámhossznál megjelenő abszorpciós csúcsot (11. ábra). Ugyanis a detergenses kezelés során a tapasztalat azt mutatta, hogy az LDAO valószínűleg durvább membránbontást végez(a csoport korábbi munkái során) vagyis összefüggő membrán fragmentek kerülnek eltávolításra, amelyek közül van olyan, amely tartalmaz Sqn fehérjét, illetve Sqn fehérjét és egyéb membránkötött fehérjéket valamint színtesteket is, így az olyan membrán fragmentek, amelyek tartalmazznak Sqr fehérjét, vagyis nem vált le róla, azok a fehérjével együtt felkötődnek az affinitás kromatográfia oszlopra és együtt eluálódnak, így jelen lesznek az elúciós frakcióban is. A DDM viszont finomabban bontja meg a membránt, viszont önállóan a membrán kötött Sqn fehérjét nem képes szolubilis állapotba vinni.

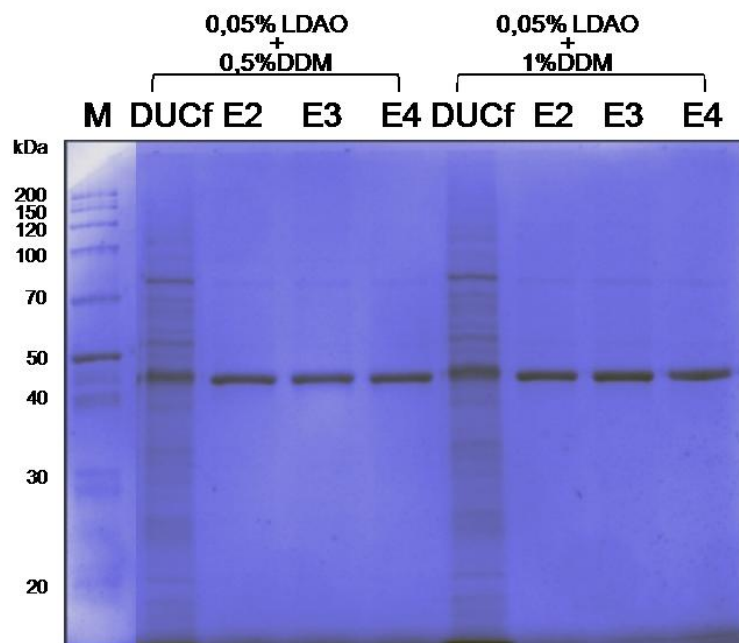


10. ábra: Sqn fehérje tisztítása affinitás kromatográfiával 0,1%; 0,05%; 0,02%-os LDAO-val kezelt és dializált FRNSQNN membrán frakciók ultracentrifuga felülúszóiból. M: marker; Mfr: membrán frakció; UCf: ultracentrifugálás után keletkezett felülúszó; DUCf: ultracentrifugálás után keletkezett dializált felülúszó E: elúciós frakció.

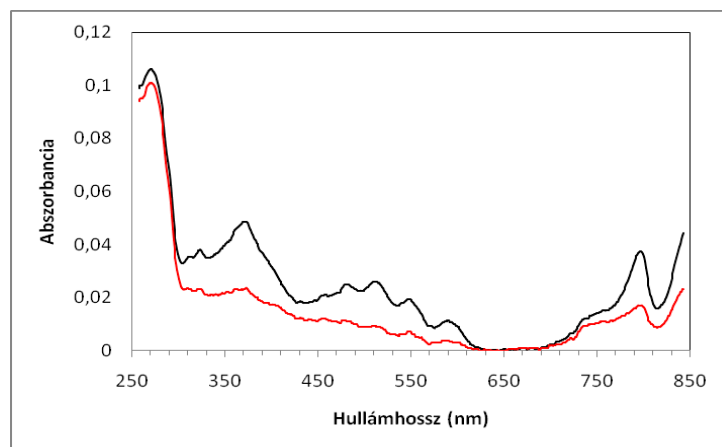


11. ábra: 0,1% (fekete); 0,05% (piros); 0,02%-os (zöld) LDAO-val kezelt és dializált FRNSQNN membrán frakcióból tisztított elúciós fehérje minták abszorpciós spektruma.

Ezért a továbbiakban a 0,05% koncentrációjú LDAO detergens mellett különböző koncentrációjú DDM alkalmazását próbáltam ki, annak reményében, hogy a detergens keverék hatékonyabban oldja fel a sejtmembrán mintákat, így nem fognak a kezelés hatására az affinitás kromatográfiás oszlopra kötődni képes kis méretű membrán darabok keletkezni. A 0,05% LDAO mellett 0,5% illetve 1% koncentrációban alkalmaztam DDM detergenst. Ezzel a módszerrel a membrán frakciókból már sikeresen tisztítottam nagy mennyiségben Sqn fehérjét (12. ábra). Amíg a 0,05% LDAO + 0,5% DDM-el történő kezelésen átesett membrán frakcióból kellő mennyiségben, addig a 0,05% LDAO + 1% DDM-el kezelt mintából nagy mennyiségben és megfelelő tisztaságban sikerült Sqn fehérjét tisztítanom (12. ábra 13. ábra).



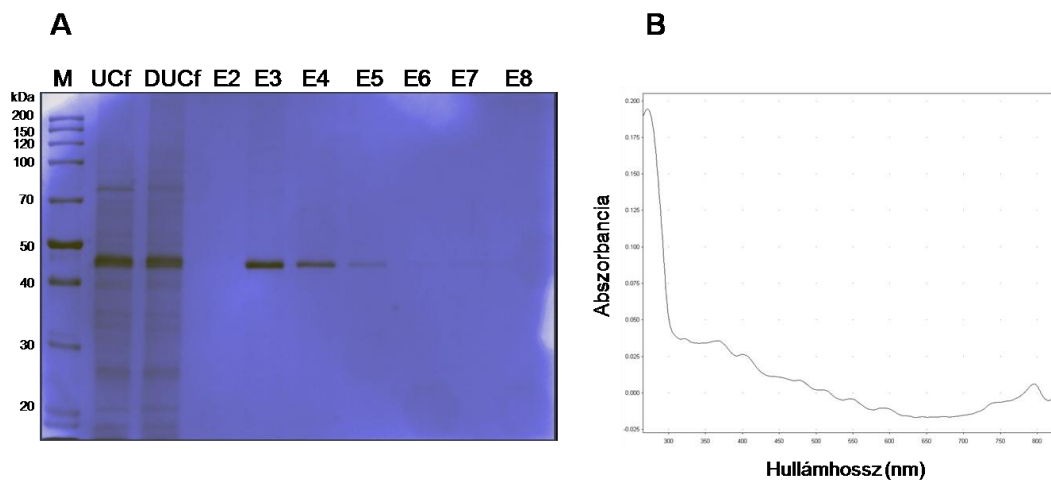
12. ábra:: Sqn fehérje tisztítása affinitás kromatográfiával 0,05% LDAO + 0,5% DDM-el illetve 0,05% LDAO + 1% DDM-el kezelt és dializált FRNSQNN membrán frakcióból. M: maker; DUCf: ultracentrifugálás után keletkezett dializált felülúszó; E: elúciós frakció.



13. ábra: 0,05% LDAO + 0,5% DDM-el (fekete) illetve 0,05% LDAO + 1% (piros) DDM-el kezelt membrán frakcióból tisztított Sqn fehérje abszorpciós spektruma.

Elfogadtam ezeket a paramétereket (0,05% LDAO + 1% DDM) a membrán oldhatóvá tételéhez mivel ezzel a módszerrel olyan minőségű fehérjét sikerült tisztítanom ami a célomnak megfelel. Az optimalizált paraméterekkel az Sqn-t nagy mennyiségben kíséreltem meg tisztítani. Ez azt jelenti, hogy eddig 250-500 ml kultúrából kíséreltem meg tisztítani a fehérjét, ezúttal viszont 1500 ml kultúrából kíséreltem meg ugyanezt, amellyel sikeresen nagy

menyiségű és tiszta rekombináns Sqn enzimet állítottam elő (14. ábra), ami leolvasható a tisztított Sqn fehérje minta abszorpciós spektrumából is.



14. ábra: A: Sqn fehérje tisztítása affinitás kromatográfiával 0,05% LDAO + 1% DDM-el kezelt és dializált FRNSQNN membrán frakcióból. M: marker; UCf: ultracentrifugálás után keletkezett felülúszó
DUCf: ultracentrifugálás után keletkezett dializált felülúszó; E: elúciós frakció.
B: 0,05% LDAO + 1% DDM-el (fekete) kezelt FRNSQNN membrán frakcióból tisztított Sqn fehérje abszorpciós spektruma (B).

5 Összefoglalás

Tudományos diákköri munkám során egy fotoszintetikus bíbor kénbaktérium, a *Thiocapsa roseopersicina* membrán kötött szulfid kinon oxidoreduktázait vizsgáltam. A mikroorganizmus genom szekvenciájában korábban azonosítva lettek a szulfid kinon oxidoreduktáz 1 (Sqr) illetve a szulfid kinon oxidoreduktáz 2 (Sqn) fehérjéket kódoló gének. A szulfid kinon oxidoreduktáz enzimek biokémiai vizsgálhatóságának érdekében elkészítettem olyan expressziós vektorokat, amelyek az Sqr (pDSQRNS) és Sqn (pDSQNNS) fehérjék N-terminálisán StrepII affinitás peptidekkel fuzionáltatott változatainak termelését képesek biztosítani. Ezen expressziós vektorokat a vad típusú szulfid oxidáz enzimeket nem tartalmazó mutáns *T. roseopersicina* törzsekbe jutattam be konjugáció segítségével.

A rekombináns Sqr illetve Sqn fehérjéket termelő törzsek enzim termelő képességét sejtmembrán frakciójukon szulfid függő kinon reduktáz aktivitásának mérésével, valamint Western analízissel ellenőriztem. Ezen vizsgálatok eredményeiből megállapítottam, hogy csak az Sqn fehérjét expresszáló törzsekben termelődik aktív szulfid kinon reduktáz enzim, ezért a következő lépésben az Sqn fehérje tisztítás módszerét dolgoztam ki.

Rekombináns Sqn fehérjék korábbi tisztítási eredményeiből arra következtettem, hogy egy membránhoz gyengén kötődő enzim, ezért DDM detergensenal kezelt membrán frakcióból affinitás kromatográfiával tisztítottam fehérjét. Az ily módon tisztított enzimeknek sem a mennyisége, sem a tisztasága nem volt még megfelelő a későbbiekben tervezett fehérje biokémiai vizsgálatok céljára, ezért a DDM mellett egy ikerionos detergenst az LDAO-t is alkalmaztam a fehérje membrántól való elválasztására. A két detergens optimalizált módon megfelelő koncentrációban való együttes alkalmazásával, majd a dializálási lépésnek a minta feldolgozásba való beépítésével kidolgoztam egy olyan tisztítási módszert, amellyel kellő mennyiségű és a további biokémiai vizsgálatokra már alkalmas tisztaságú szulfid kinon reduktáz 2 enzimet tudtam előállítani.

6 Irodalomjegyzék

Argyrou A, Blanchard JS. (2004) Flavoprotein disulfide reductases: advances in chemistry and function. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* **78**:89–142.

Ausubel, F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K. (1996) *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley, New York, NY.

Benemann, J., (1996) Hydrogen biotechnology: progress and prospects. *Nat Biotechnol.* **14**:1101-1103.

Brito JA, Sousa FL, Stelter M, Bandejas TM, Vonnheim C, Teixeira M, Pereira MM, Archer M. (2009) Structural and functional insights into sulfide:quinone oxidoreductase. *Biochemistry.* **48**:5613– 5622.

Bogorov, L.V., (1974) The properties of *Thiocapsa roseopersicina*, strain BBS, isolated from an estuary of the White Sea. *Mikrobiologiya.* **43**:326-332

Brune, D.C. (1995b) Sulfur compounds as photosynthetic electron donors. In: *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria* (R.E. Blankenship, M.T. Madigan and C.E. Bauer, eds), *Advances in Photosynthesis.* **Vol. 2**, pp. 847–870. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Chan LK, Morgan-Kiss RM, Hanson TE. Functional analysis of three sulfide:quinone oxidoreductase homologs in *Chlorobaculum tepidum*. *J Bacteriol* 2009;**191**:1026–1034.

Chen, Z.W., Koh, M., van Driessche, G., van Beeumen, J.J., Bartsch, R.G., Meyer, T.E., Cusanovich, M.A. and Mathews, F.S. (1994) The structure of flavocytochrome c sulfide dehydrogenase from a purple phototrophic bacterium. *Science*. **266**, 430–432.

Emsley P, Cowtan K. Coot: (2004) model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr Sect D*. **60**:2126–2132.

Gorlenko, V.M., (1974) Oxidation of thiosulphate by *Amoebacter roseus* in darkness under microaerobic conditions. *Mikrobiologiya* **40**:1035-1039

Griesbeck, C., Hasuka, G., Schütz, M., (2000). Biological Sulfide- Quinone Reductase (SQR), *The Primary Reaction. Recent Research Developments in Microbiology*, **4**: 179-203

Heuts DP, Scrutton NS, McIntire WS, Fraaije MW. (2009) What's in a covalent bond? On the role and formation of covalently bound flavin cofactors. *FEBS J*. **276**:3405–3427.

Hildebrandt TM, Grieshaber MK. (2008) Three enzymatic activities catalyze the oxidation of sulfide to thiosulfate in mammalian and invertebrate mitochondria. *FEBS J*. **275**:3352–3361.

Imhoff, J.F., (2005a) Family I. *Chromatiaceae* *Bavendamm* 1924, 125^{AL} emend, Imhoff 1984b, 339. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. (Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T., Garrity, G.M.). **2**: 3-40, Part B Springer, New York

Imhoff, J.F., (2008) Systematics of anoxygenic phototrophic bacteria. Sulfur Metabolism in Phototrophic Organisms. (Hell, R., Dahl, C., Knaff, D.B., Leustek, T.), *Advances in Photosynthesis and Respiration*. **27**: 269-287, Springer, New York

Inoue, H., Nojima, H., Okoyama, H., (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*. **96**:23-28

Kämpf, C., Pfennig, N., (1980) Capacity of Chromatiaceae for chemotrophic growth. Specific respiration rates of *Thiocystis violaceae* and *Chromatium vinosum*. *Arch. Microbiol.* **127**:125-135

Kondrat'eva, E.N., Zhukov, V.G., Ivanovskii, R.N., Petushkova, Y.P. and Monosov, E.Z. (1976) The capacity of the phototrophic sulfur bacterium *Thiocapsa roseopersicina* for chemosynthesis. *Arch. Microbiol.* **108**, 287–292.

Kondrat'eva, E.N., Zhukov, V.G., Ivanovskii, R.N., Petushkova, Y.P. and Monosov, E.Z., (1981) Light and dark metabolism in purple sulfur bacteria. *Sov. Sci. Rev.* **2**:325-364

Kostanjevecki, V., Brige, A., Meyer, T.E., Cusanovich, M.A., Guisez, Y. and van Beeumen, J. (2000) A membrane-bound flavocytochrome c-sulfide dehydrogenase from the purple phototrophic sulfur bacterium *Ectothiorhodospira vacuolata*. *J. Bacteriol.* **182**, 3097–3103.

Le Faou, A., Rajagopal, B.S., Daniels, L., Fauque, G., (1990)- Thiosulfate, polythionates and elemental sulfur assimilation and reduction in the bacterial world. *FEMS Microbiology Letter.* **6**:351-81

Marcia M., U. Ermler, Peng G., Michel H. (2010) A new structure-based classification of sulfide:quinone oxidoreductases. *Proteins*, **78**:1073–1083.

Marcia M, Ermler U, Peng G, Michel H. (2009) The structure of *Aquifex aeolicus* sulfide:quinone oxidoreductase, a basis to understand sulfide detoxification and respiration. *Proc Natl Acad Sci USA*. **106**:9625–9630.

Meyer, T.E. and Cusanovich, M.A. (2003) Discovery and characterization of electron transfer proteins in the photosynthetic bacteria. *Photosyn. Res.* **76**, 111–126.

Pfennig N., Trüper, H. G., (1992). The Family *Chromatiaceae* *The Prokaryotes* vol .IV,3200-3221.

Pham VH, Yong JJ, Park SJ, Yoon DN, Chung WH, Rhee SK. (2008) Molecular analysis of the diversity of the sulfide:quinone reductase (sqr) gene in sediment environments. *Microbiology*. **154**:3112– 3121.

Reinartz M, Tschape J, Bruser T, Truper HG, Dahl C. (1998) Sulfide oxidation in the phototrophic sulfur bacterium *Chromatium vinosum*. *Arch Microbiol.* **170**:59–68.

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY

Shibata H, Kobayashi S. (2006) Characterization of a HMT2-like enzyme for sulfide oxidation from *Pseudomonas putida*. *Can J Microbiol.* **52**:724–730.

Shibata H, Suzuki K, Kobayashi S. (2007). Menaquinone reduction by an HMT2-like sulfide dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus*. *Can J Microbiol.* **53**:1091–1100.

Schütz, M., Shahak, Y., Padan, E., Hasuka, G., (1997) Sulfide-quinone reductase from *Rhodobacter capsulatus*, *J. Biol. Chem.* **272**:9890-9894

Schütz, M., Maldener, I., Griesbeck, C., Hasuka, G., (1999) Sulfide-quinone reductase from *Rhodobacter capsulatus*: requirement for growth, periplasmic localization, and extension of gene sequence analysis. *J Bacteriol.* **181**:6516-6523

Theissen U, Martin W. Sulfide:quinone oxidoreductase (SQR) from the lugworm *Arenicola marina* shows cyanide- and thioredoxin-dependent activity. *FEBS J* 2008;**275**:1131–1139.

Vande Weghe JG, Ow DW., (1999) A fission yeast gene for mitochondrial sulfide oxidation. *J Biol Chem.* **274**:13250–13257.

Visscher, P.T., Nijburg, J.W., Gernerden, H., (1990), Polysulfide utilization by *Thiocapsa roseopersicina*. *Archives of Microbiology.* **155**:75–81

Yeang H. Y., Yusof F., Abdullah L. (1998), Protein purification for the Lowry assay: acid precipitation of proteins in the presence of sodium dodecyl sulfate and other biological detergents. *Anal. Biochem.*, **265**: 381-384.

7 Köszönetnyilvánítás

Köszönöm Dr. Rákhely Gábornak, Dr. Tóth Andrásnak a rám áldozott idejéért, Dúzs Ágnesnek szintén az idejéért, valamint, hogy bevezetett a gyakorlati labor életbe, Prof. Kovács L. Korélnak, valamint az SZTE Biotechnológiai Tanszék minden kedves munkatársának a munkám során nyújtott segítségükért.

Nyilatkozat

Alulírott **Dobos András** IV. éves biomérnök BSc szakos hallgató, kijelentem, hogy a tudományos diákköri dolgozatomban foglaltak saját munkám eredményei, és csak a hivatkozott forrásokat (szakirodalom, eszközök, stb.) használtam fel.

2012-11-05

Dobos András

Szeged

.....

Rövidítés jegyzék

μl: mikroliter

bp: bázis pár

Å: angström

BSA: szarvasmarha szérum albumin

CIAP: Borjú bélből származó alkalikus foszfatáz (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase)

DDM: N-dodecil-β-D-maltozid

DNS: dezoxi-ribonukleinsav

DQ: durokinon

EDTA: etiléndiamin-tetraecetsav

EtBr: etídium-bromid

EtOH: etil-alkohol

FAD: flavin-adenin-dinukleotid

g: nehézségi gyorsulás

HABA: hidroxil-azofenil-benzoidsav

kDa: kiloDalton

Km: kanamicin

LB: Luria-Bertani

LDAO: N,N-Dimetildodecilamin-N-oxiddal

ml: milliliter

NAD⁺: nikotinamid-adenin-dinukleotid

Na₂S: nátrium- szulfid

nm: nanométer

OD: optikai denzitás

PAGE: poliakrilamid gélelektroforézis

PCR: polimeráz láncreakció (Polymerase Chain Reaction)

rpm: fordulatszám / perc

SDS: nátrium-dodecilszulfát (Sodium Dodecil Sulfate)

TAE: Tris-Acetát-EDTA

TEMED: N, N, N',N'-tetrametil-etiléndiamin

TGS: Tris-Glicin-SDS

Tris: Tris-(hidroximetil)-metilamin