

XXXI. OTDK Biológia Szekció

Dobrotka Paula

IV. éves Biomérnök BSc

MTA SZBK Biofizikai Intézet
SZTE TTIK Biotechnológiai Tanszék

***A Thiocapsa roseopersicina egy szulfid kinon
oxidoreduktáz típusú enzimének tisztítása és
jellemzése***

Témavezetők:

Dr. Tóth András tudományos munkatárs

Dr. Rákhely Gábor egyetemi docens

2012



Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	2
1. Bevezetés	4
2. Irodalmi áttekintés.....	5
2.1 Fotoszintetikus baktériumok	5
2.2 Fototróf kénbaktériumok.....	5
2.4 Fototróf bíbor kénbaktériumok oxidatív kénanyagcseréje.....	6
2. 5 Szulfid kinon oxidoreduktáz enzimek.....	8
2.5.2 Szulfid kötőhely a szulfid kinon oxidoreduktáz enzimekben	10
2.5.3 Kinon kötőhely a szulfid kinon oxidoreduktáz enzimekben	10
2.5.4. C-terminális régió a szulfid kinon oxidoreduktáz enzimekben.....	11
2.6 <i>Thiocapsa roseopersicina</i> BBS.....	11
2.6.1 A <i>Thiocapsa roseopersicina</i> szulfid kinon oxidoreduktáz 1 (Sqr) fehérjéje.....	12
2.6.2 A <i>Thiocapsa roseopersicina</i> szulfid kinon oxidoreduktáz 2 (Sqn) fehérjéje.....	12
3. Célkitűzések	14
4. Anyagok és módszerek	15
4.1 <i>Thiocapsa roseopersicina</i> tenyésztése	15
4.2 <i>Thiocapsa roseopersicina</i> sejtek kezelése	15
4.2.1 Szferoplaszt előállítás <i>Thiocapsa roseopersicina</i> sejtekből.....	15
4.2.2 <i>Thiocapsa roseopersicina</i> sejtek feltárása.....	16
4.2.3 Membrán és szolubilis sejtfrakciók elválasztása.....	16
4.3 Fehérje tisztítás és analízis	17
4.3.1 Fehérje tisztítása affinitás kromatográfiával	17
4.3.2 Denaturáló poliakrilamid gélelektroforézis.....	17
4.3.3 Western hibridizáció	18
4.4 Tisztított fehérjék vizsgálata	19

4.4.1 Fehérje mennyiségi meghatározása Micro-Lowry módszerrel	19
4.4.2 Fehérje abszorpciós spektrumának meghatározása	19
4.4.3 Fehérje szulfid függő kinon redukáló aktivitásának mérése	20
4.4.4 Tisztított fehérje flavin csoport tartalmának vizsgálata	20
5. Eredmények és megvitatásuk	21
5.1 Rekombináns szulfid kinon oxidoreduktáz 2 fehérje tisztítása <i>Thiocapsa roseopersicina</i> -ból	21
5.2 Szulfid kinon reduktáz 2 fehérje abszorpciós spektrumának vizsgálata	27
5.3 Szulfid kinon reduktáz 2 fehérje flavin csoport tartalmának vizsgálata	28
5.4 Szulfid kinon oxidoreduktáz 2 fehérje aktivitásának meghatározása	29
5.4.1 Szulfid kinon oxidoreduktáz 2 fehérje aktivitásának hőmérséklet függése	30
5.4.2 Szulfid kinon oxidoreduktáz 2 fehérje aktivitásának pH függése	31
5.4.3 Szulfid kinon oxidoreduktáz 2 fehérje aktivitásának enzimkinetikai jellemzői.....	33
5.5 Az Sqn sejten belüli elhelyezkedésének vizsgálata <i>Thiocapsa roseopersicina</i> -ban	34
6. Összefoglalás	37
7. Hivatkozások.....	39
8. Rövidítés jegyzék	42
9. Köszönetnyilvánítás	43
10. Nyilatkozat	44

1. Bevezetés

Az emberiség egyre növekvő energiaigényének következtében a fosszilis energiahordozók, mint például a kőolaj-, földgáz- és szénforrások kimerülőben vannak. Felhasználásuk során melléktermékként képződő szén-dioxidnak köszönhetően a fokozódó üvegházhatás klímaváltozás lehetőségét hordozza magában. Ezért egyre nagyobb hangsúlyt kell fektetni a fosszilis energiahordozók felváltását lehetővé tevő alternatív, környezetbarát energiahordozók kutatására.

Számos alternatív megoldás közül a hidrogén gáz tűnik a legígéretesebbnek, hiszen felhasználása során káros melléktermék nem, csupán víz keletkezik. Éppen ezért az elmúlt években a hidrogéntermelés kutatása egy meglehetősen nagy tudományterületté nőtte ki magát. Három különböző módszert ismerünk a hidrogén előállítására. Az elektrokémiai hidrogéngyártás során a víz elektrolízisével történik a hidrogén előállítása, míg a legismertebb kémiai módszerek egyike a gőzreformálás technológiáján alapul, azonban ezen módszerek felhasználása során a hidrogén gyártásához szükséges energiát fosszilis energiahordozókból nyerik ki.

Így jutunk el a biológiai hidrogéntermelésig, melynek egyik alapvető útja a Nap energiáját megkötő és felhasználó fotoszintetikus baktériumok segítségével valósítható meg. Számos olyan mikroorganizmus ismert, mely hidrogenáz és nitrogenáz enzimrendszerének köszönhetően képes hidrogént termelni a napfény energiájának, valamint szerves vagy szervetlen redukált vegyületek elektron donorként történő felhasználásával. A nitrogenáz enzimmel rendelkező baktériumok képesek légköri nitrogén jelenlétében nitrogénfixálásra, mely folyamat melléktermékeként hidrogén termelődik. A hidrogenázok redox metalloenzimek, melyek hidrogéntermelést katalizálva a sejtek redox egyensúlyának fenntartása érdekében a felesleges elektronokat távolítják el protonok redukciójával.

A kénanyagcsere során redukált kénvegyületekből felszabaduló elektronok részt vesznek a protonok redukciójában, mely eredményeként hidrogén keletkezik. Így a hidrogén biológiai úton történő hatékony előállításához elengedhetetlen a keletkezésével szoros kapcsolatban álló kénanyagcsere ismerete. Laboratóriumunkban intenzív kutatások folynak egy fototróf bíbor kénbaktérium, a *Thiocapsa roseopersicina* hidrogén- és kénanyagcseréjében résztvevő enzimrendszerek megismerésére, melynek célja a jövő energiahordozóját nagy hatásfokkal termelő törzs létrehozása.

2. Irodalmi áttekintés

2.1 Fotoszintetikus baktériumok

A fototróf prokarióták legfontosabb tulajdonsága, hogy tetraapirol pigmentekkel és fotoszintetikus apparátussal rendelkeznek, melyek lehetővé teszik a fényfüggő elektron transzfert és ennek útján a fényenergia kémiai energiává való átalakítását. A fotoszintetikus baktériumoknak csupán néhány csoportját különböztetjük meg alapvető fiziológiás eltéréseik alapján. Az első csoportba az aerob *Cianobaktériumok* tartoznak, melyek a vízmolekulák elektron donorként való hasznosítása során molekuláris oxigént termelnek. A második csoport tagjai az aerob fototróf baktériumok (*Heliobaktériumok*, továbbá bíbor és zöld baktériumok), amelyek hidrogént, szerves vegyületeket, illetve redukált kénvegyületeket használnak fel elektronforrásként. Az utolsó csoport az aerob, de oxigént nem termelő, bakterioklorofill-tartalmú (ABC – aerobic bacteriochlorophyll-containing) baktériumok, ahova néhány, egyelőre kevésbé ismert, leginkább kemoheterotróf tulajdonságokkal rendelkező *Proteobaktérium* tartozik, melyek ugyancsak képesek fényfüggő elektron transzportot végezni fotoszintetikus pigment-fehérje komplexek segítségével (Imhoff, 2008).

2.2 Fototróf kénbaktériumok

A redukált kénvegyületek – különösképp a szulfid – fotoszintetikus elektron donorként történő hasznosítása általános az anaerob fototróf baktériumok legtöbb csoportjában, bár eltérő mértékben. E tekintetben a bíbor kénbaktériumok továbbá a zöld kénbaktériumok együttesen alkotják a mikrobák azon csoportját, melyek képesek redukált kénvegyületeket elektron forrásként felhasználni, ezért a fototróf kénbaktérium elnevezést kapták. Mellettük számos bíbor nem-kén baktérium, néhány anaerob heliobaktérium, továbbá fonalas fototróf mikrobák egyes tagjai is képesek redukált kénvegyületek oxidálására fototróf növekedésük során.

2.3 Bíbor kénbaktériumok

A Gammaproteobaktériumok osztályába tartozó bíbor kénbaktériumok a *Chromatiaceae* és az *Ectothiorhodospiraceae* család tagjai, melyek között a legfontosabb különbség az elemi kén raktárként funkcionáló kénglobulusok képzésében figyelhető meg. Míg az előbbi csoportban található baktérium fajok szulfidon, polisulfidon, tioszulfáton illetve elemi kénen való növesztése során ezen folyamat a sejtfalon belül történik, addig az *Ectothiorhodospiraceae* családba tartozó baktériumokban a kénglobulusok extracellulárisan, a periplazmatikus térben halmozódnak fel.

A *Chromatiaceae* családba tartozó baktériumokat változatos anyagcserével, illetve speciális anyagcserével rendelkező fajok két fő csoportjára különíthetjük el. Míg az utóbbi fajok kizárólag szulfidot képesek felhasználni elektrondonorként, addig a változatos anyagcserével rendelkező mikrobák, mint például az *Allochromatium vinosum*, tioszulfátot, szulfidot továbbá elemi ként hasznosítanak elektron forrásként (Imhoff és mts., 2005a). A legtöbb ide tartozó faj képes asszimilációs szulfát redukcióra, redukált kénvegyületek hiányában fotoorgano-heterotróf, míg azok jelenlétében kemolitotróf életmódot folytatnak (Gorlenko, 1974; Kämpf és Pfennig, 1980; Kondrat'eva és mts., 1981). Néhányan közülük képesek kemoorganotróf módon növekedni, mely esetben a szulfid vagy a tioszulfát elengedhetetlen, mint kénforrás, mivel a szulfát asszimiláció gátolt aerob körülmények között (Kondrat'eva és mts., 1981).

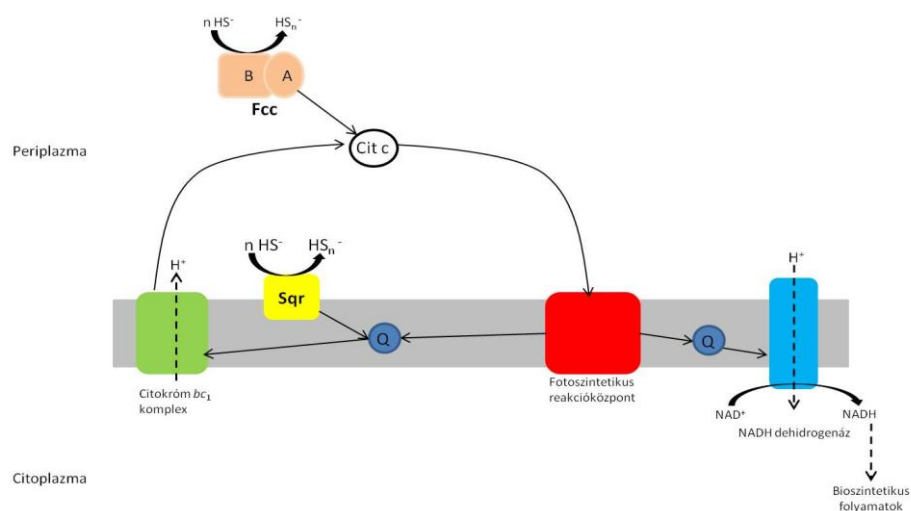
2.4 Fototróf bíbor kénbaktériumok oxidatív kénanyagcseréje

A fototróf bíbor kénbaktériumok képesek elemi kén, tioszulfát illetve szulfid elektron forrásként történő hasznosítására. A redukált kénvegyületek oxidálása által szolgáltatott elektronok a sejtmembrán kinon raktárába kerülve túlnyomórészt a NAD^+ redukciójára fordítódnak, mely ezt követően a szén-dioxid megkötés nagy elektronigényét fedezi a sejt felépítő anyagcsere folyamataiban (Brune, 1989).

Bíbor kénbaktériumokban a tioszulfát szulfáttá történő részleges oxidációját a periplazmatikus Sox enzimrendszer katalizálja. A folyamat során felszabaduló elektronok c-típusú citokróm fehérjék útján jutnak el a membrán kinon molekuláihoz. A

tioszulfát nem oxidálódó kénatomja a kénglobulusokban halmozódik fel. Az elemi kén oxidációjának biokémiai útvonala részleteiben még nem felderített, feltehetően alapvető szerepet játszanak benne a Dsr (disszimilációs szulfit reduktáz) enzimszisztéma citoplazmatikus, illetve a sejtmembrán citoplazmatikus oldalához kötődő fehérjéi. A Dsr redox enzimszisztéma az elemi kén valamely formájából felszabadított elektronokat közvetlenül képes a kinon raktárba juttatni.

Az elektronok transzportja a szulfid és a NAD^+ között kétféleképpen valósulhat meg szulfid oxidáz enzimek közreműködésével (1. ábra). Az egyik útvonal egy szolubilis periplazmatikus fehérjén, a flavocitokróm c (Fcc) enzimén át vezet, mely egy nagy, flavin csoport tartalmú, a szulfid megkötésében és oxidációjában szerepet játszó alegységből (FccB), továbbá egy kisebb, egy vagy két hem csoport megkötésére képes citokróm c típusú fehérje alegységből (FccA) épül fel. Ezen enzim a szulfid oxidálása során felszabaduló elektronokkal periplazmatikus c-típusú citokróмокat redukál, ahonnan azok a következő lépésben a fotoszintetikus reakcióközpontba kerülnek. Itt a megkötött fény energiájának segítségével redukálnak membrán kinon molekulákat és ezzel bekerülnek a fotoszintetikus elektronáramlásba. A szulfid oxidálása során felszabaduló elektronok másik lehetséges útvonala a membrán kötött szulfid kinon oxidoreduktáz (Sqr) enzimeken keresztül valósul meg. A flavocitokróm c enzimhez hasonlóan szulfid oxidációt katalizálni képes Sqr fehérjék a szulfidról érkező elektronokat, az Fcc-hez képest energetikailag kedvezőbb módon, közvetlenül képesek a membránban található kinon raktárba juttatni (Blankenship, 1992).



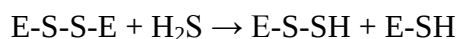
1. ábra: Bíbor kénbaktériumok szulfid oxidáló enzimei és az anyagcsere folyamatokban betöltött szerepük. FccAB: flavocitokróm c kis(A) és nagy(B) alegységei; Sqr: szulfid kinon oxidoreduktáz; Cit c: citokróm c; Q: membránban található kinon raktár.

2. 5 Szulfid kinon oxidoreduktáz enzimek

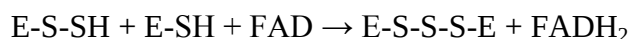
A szulfid kinon oxidoreduktáz egy körülbelül 55 kDa méretű membrán kötött fehérje, melynek jelenléte elengedhetetlen az olyan foto- és kemolitotróf organizmusokban, melyek elektronforrásként szulfidot használnak fel, mivel működése során képes szulfid függő kinon redukciót katalizálni (Arieli és mts., 1994, Shütz és mts., 1997). Az Sqr fehérjék rendkívül ősi flavoproteinek, amelyek a flavin-tartalmú diszulfid reduktáz nagy fehérjecsald glutathion reduktáz alcsaládjába tartoznak (Shahak és mts., 1999). Mérések szerint az enzim szulfid függő kinon redukáló aktivitásának hőmérséklet optimuma megközelítőleg 20°C, bár ez fajonként eltérő lehet. Így például az *Aquifex aeolicus* hipertermofil baktériumban található Sqr fehérje 70°C-on a legaktívabb (Nübel és mts., 2000).

Az Sqr sejten belüli elhelyezkedését *Rhodobacter capsulatus*-ban vizsgálták, olyan módszerrel, hogy az enzimet kódoló gént egy alkalikus foszfatáz fehérje génjével fuzionáltatták. A periplazmatikus foszfatáz aktivitása kimutatható volt, ami bizonyította, hogy a *R. capsulatus*-ban található szulfid kinon oxidoreduktáz a sejtmembrán periplazma felőli oldalán található (Shütz és mts., 1999). A fehérjék citoplazma membránon történő átjutása általában kétféleképpen történhet: sec-függő és sec-független fehérje transzlokációs útvonalon (Berk, 1996), amihez mindkét esetben szükség van egy N-terminális szignál peptidre. Az Sqr fehérjék esetében ilyen szignál szekvenciát nem találtak, azonban *R. capsulatus*-ban végzett fehérje deléciós kísérletek kimutatták, hogy egy, a C-terminálison található 38 aminosavból álló szakasz elengedhetetlen a transzlokáció végbemeneteléhez (Shütz és mts., 1999).

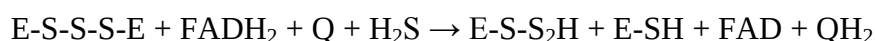
Az Sqr szulfid oxidálásának mechanizmusára felállítottak egy modellt, melyben az enzimben található, egymáshoz diszulfid híddal kapcsolódó két cisztein játszik alapvető szerepet (Griesbeck és mts., 2000). Szulfid jelenlétében a két cisztein elválik egymástól, ezáltal egy redukált, továbbá egy tiolcsoporthoz kötött cisztein keletkezik:



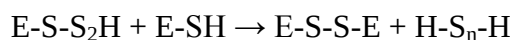
A második lépésben a FAD redukálódik, és egy triszulfid híd képződik:



Ezután a flavinról az elektronok átkerülnek a kinonra, majd egy második szulfid molekula kötődik az enzimhez:



A második és harmadik lépés többszöri ismétlődése során egy poliszulfid lánc képződik, amely néhány enzimeciklust követően felszabadul, mialatt az enzimen kialakul a kezdeti diszulfid híd:



2.5.1 FAD kötőhely a szulfid kinon oxidoreduktáz enzimekben

Különböző fajokban vizsgált flavintartalmú Sqr fehérjéknél megfigyelték, hogy a FAD kofaktor kétféleképpen helyezkedhet el az enzimen belül: kovalensen kötött módon egy konzervált, katalitikusan esszenciális ciszteinhez (Cys127) kapcsolódva, vagy nem kovalensen kötődve, mint például az *Acidithiobacillus ferrooxidans*-ban (Cherney és mts., 2010).

Különböző mikroorganizmusokból származó Sqr enzimek szekvencia vizsgálatát végezték el. Ezekből kiderült, hogy az enzimen belül három, a glutation reduktáz családba tartozó flavoproteinekre jellemző FAD kötő motívum található: az N-terminálison elhelyezkedő $\beta\alpha\beta$ -redő (Wierenga és mts., 1986), továbbá két másik, a fehérje N- illetve C-terminális végéhez közel eső régió (Schütz és mts., 1997; Eggink és mts., 1990). Ezen jellemző motívumok részletes vizsgálatát többek között a *R. capsulatus* Sqr fehérjéjének esetében végezték el (Griesbeck és mts., 2000).

Az első szekvencia motívumban 3 konzervált glicin található: a Gly8, Gly10 és a Gly13. Ezek feltehetően helyet biztosítanak a FAD foszfát-csoportjainak, amelyek oxigén atomjaival közvetlenül, vagy vízmolekulákon keresztül képesek hidrogén hidakat létesíteni. A második β -lemez-ben található Asp36 aminosav karboxilcsoportja kapcsolódik a FAD koenzimben található ribóz molekula hidroxil-csoportjaihoz, ezzel is erősítve a kofaktor fehérjéhez való kötődését.

A második motívum szintén tartalmaz egy glicint (Gly106), továbbá egy alanint (Ala104), amely kapcsolódhat a FAD ribitol láncához. Emellett található benne még két konzervált aminosav – egy tirozin (Tyr98) és egy aszparaginsav (Asp99) – ám a FAD megkötésében betöltött szerepük még nem tisztázott.

Lehetséges, hogy a harmadik motívum is rendelkezik egy konzervált glicinnel (Gly299), mely elhelyezkedését tekintve alkalmas lehet a FAD foszfát csoportjainak befogadására. A hidrofób környezet biztosításáért a 296 és 298 pozícióban elhelyezkedő aromás és hidrofób aminosavak felelhetnek. Meglepő, hogy egy aszparaginsav – amely

kölcsönhatásba lép a FAD-ban található flavin molekula ribitol láncával – amely az összes glutation reduktáz családba tartozó flavoproteinben, így a flavocitokróm c nagy alegységében is megtalálható, az Sqr fehérjéből hiányzik (Shütz és mts., 1997).

2.5.2 Szulfid kötőhely a szulfid kinon oxidoreduktáz enzimekben

Az Sqr-ben feltételezhetően három konzervált aminosav vesz részt a szulfid megkötésében: a Cys127, a Cys159 és a Cys353 melyekből a két utóbbi hasonló helyzetben található, mint az FccA fehérje redox-aktív ciszteinjei. *R. capsulatus*-ban végzett irányított mutagenézis vizsgálatok során kiderült, hogy a három cisztein jelenléte elengedhetetlen az Sqr aktivitásához, részt vesznek az Sqr-ben lejátszódó katalitikus reakcióban (Griesbeck, 2000), de a FAD megkötésében nincs szerepük.

2.5.3 Kinon kötőhely a szulfid kinon oxidoreduktáz enzimekben

Az Sqr enzim lehetséges kinon kötőhelyének kutatása során két, hisztidineket (His131 és a His196) tartalmazó régió került azonosításra, melyek feltételezhetően részt vehetnek a kinon megkötésében. Számos fehérje röntgen-krisztallográfiás vizsgálatát követően felállítottak egy modellt a kinon kötőhely szerkezetére (Rich és Fisher, 1999).

Ez a kinon fejcsoportjával szomszédosan található helikális szakasz egy szoros kapcsolatban álló aminosav hármast tartalmaz, melyben a központi hisztidin képes hidrogén hidat alkotni a kinon egy karbonil-csoportjával. A hisztidintől N-terminális irányban található negyedik alifás aminosav egy leucin, amely a három aminosav közül a legközelebb helyezkedik el a kinon izoprenoid oldalláncához. A különböző kinon-kötő fehérjékben található homológ szekvenciákon belül erősen konzervált, szoros kapcsolatban álló aminosav hármas utolsó tagja a központi hisztidintől három-négy aminosavra, a C-terminális irányban helyezkedik el.

A *R. capsulatus*-ban található Sqr His131 aminosav egy feltételezhető α -hélixben található konzervált szakasz tagja [Ser-Ile/Val-Cys-(X)₃-His-Ala-(X)₂-Ala], továbbá a His196 is egy konzervált régió részét képezi [Glu-Pro-Tyr-Val/Leu-Gly-His-Leu/Phe-Gly-Leu/Ile]. Bár a két régió némileg eltér a felállított modellben leírt kinon-kötő motívumoktól, megfelelő jelöltek lehetnek az Sqr kinon kötőhelyeire, különösen a

His131 közvetlen közelében található alifás és aromás aminosavak alkalmasak a kinon-kötő zseb kialakításában való részvételre.

2.5.4. C-terminális régió a szulfid kinon oxidoreduktáz enzimekben

A fent említett motívumokon kívül számos egyéb, konzervált aminosavakat tartalmazó szakaszt azonosítottak Sqr fehérjékben. Ilyen például a C-terminális régió, ahol jelentősen nagyfokú hasonlóság fedezhető fel az Sqr enzimek között. Négy aromás aminosav, négy pozitívan töltött és két negatív töltésű aminosav különleges jelentőséggel bír a C-terminális funkciójának tekintetében a glutation-reduktázok körében. Ezen homodimer enzimek kialakulása során a C-terminális régió részt vesz az alegységek közötti katalitikus hely létrehozásában, emellett a régióban található egyes aminosavak sóhidak kialakításával stabilizálják a dimerek szerkezetét (Karplus és mts., 1987). Gélszűrési kísérletek (Shütz és mts., 1997), illetve natív gélelektroforézissel végzett vizsgálatok (Shütz, 1997) eredményei arra utalnak, hogy a *R. capsulatus*-ban található Sqr valószínűleg homodimer formában fordul elő.

2.6 *Thiocapsa roseopersicina* BBS

A *Thiocapsa roseopersicina* a *Chromatiaceae* családba tartozó Gram-negatív anaerob bíbor kénbaktérium (Gogotov, 1976, Pfennig és Trüpper 1991), melynek a BBS elnevezésű törzsét a Jeges-tengerből izolálták. Optimális növekedési hőmérséklete 25-28°C (Bogorov, 1974), tápfolyadékban nevelve kultúrája 4-6 nap alatt nő fel, táplemezen megközelítőleg két hét alatt képez telepeket. Változatos anyagcseréje során hidrogenáz és kén oxidáló enzimei révén képes a hidrogén, továbbá redukált kénvegyületek elektron donorként történő felhasználására. Nitrogenáz enzimrendszerének köszönhetően a légköri nitrogén megkötése során melléktermékként hidrogént állít elő.

Csoportunk korábbi munkái során a *T. roseopersicina* genom szekvenciájában azonosítva lettek a flavocitokróm c enzim alegységeit, valamint egy szulfid kinon oxidoreduktáz enzimet kódoló génnek. Más mikroorganizmusokhoz hasonlóan, a *T. roseopersicina* genom szekvencia vizsgálata során találtak még egy, az Sqr enzimmel

nagyfokú homológiát mutató fehérjét kódoló gént. Termékének feltehetően szintén a szulfid oxidálásában lehet szerepe, ezért szulfid kinon oxidoreduktáz 2 (Sqn) elnevezést kapta.

2.6.1 A *Thiocapsa roseopersicina* szulfid kinon oxidoreduktáz 1 (Sqr) fehérjéje

A *T. roseopersicina* Sqr fehérjében számos olyan konzervált aminosav található, amelyeknek más fajok Sqr fehérjéin végzett struktúra-funkció vizsgálatok alapján szerepük lehet FAD, szulfid illetve kinon megkötésében, és az enzim katalitikus működésében (2. ábra). Így például azonosíthatóak a FAD megkötésében szerepet játszó három konzervált motívumra jellemző aminosav szekvenciák, melyből arra lehet következtetni, hogy a *T. roseopersicina* Sqr fehérjéje, más ismert szulfid kinon oxidoreduktázokhoz hasonlóan, alkalmas FAD kofaktort megkötésére.

A 146-os pozícióban elhelyezkedő hisztidin, továbbá a közvetlen közelében található aminosavak teljes azonosságot mutatnak a *R. capsulatus* egyik feltételezett kinon kötő helyének központi His131 pozíciójú aminosavával, valószínűleg ez a régió játszhat szerepet a fehérje kinon szubsztrátjának megkötésében.

A C-terminális régióban jelenlévő aminosavak nagyfokú hasonlóságot mutatnak az Sqr enzimek membránhoz való kötődését biztosító konzervált aminosavakkal. Ezen szakasz vesz részt a fehérjedimerek létrehozásában, továbbá lehetővé teszik a két α -hélix kialakítását. Ez alapján a *T. roseopersicina* Sqr fehérjének C-terminális régiója is hasonló funkciókat tölthet be az enzim működésében.

2.6.2 A *Thiocapsa roseopersicina* szulfid kinon oxidoreduktáz 2 (Sqn) fehérjéje

A *T. roseopersicina* genom szekvenciájában egy második szulfid kinon oxidoreduktáz típusú fehérjét (Sqn) kódoló gén is azonosítható volt. Az Sqn és Sqr fehérjék viszonylag kismértékű azonosságot (26%) és hasonlóságot (41%) mutatnak egymáshoz képest. A legnagyobb mértékű hasonlóság a két enzim közt az Sqr enzimen azonosítható, feltehetően funkcionális szereppel bíró konzervált aminosavak és motívumok között fedezhető fel (2. ábra).

Az Sqn fehérje szekvenciájában is megtalálható a FAD megkötéséhez szükséges három motívum, mely arra utal, hogy az Sqn is egy FAD tartalmú flavoprotein.

Azonosítható két olyan cisztein (Cys121, Cys332), amelyek az Sqr szulfid kötésében szerepet játszó ciszteinekhez hasonló helyet foglalnak el az Sqn fehérjében.

A *R. capsulatus* Sqr enzimében azonosított kinon kötő motívumainak egyértelmű megfelelői a *T. roseopersicina* Sqn enzimében nem találhatók meg, ám vannak olyan hisztidinek a motívumokhoz közeli helyzetben (His116, His216, His219), melyeknek szerepe lehet a kinon megkötésében.

C-terminális régiójában csak az egyik konzervált α -hélix kialakításában részt vevő aminosavak megfelelői azonosíthatók, ami kérdésessé teszi, hogy az Sqn fehérjékben betölt-e ez a régió membránhoz kötő, illetve dimer kialakító és stabilizáló szerepet.

Sqr	MARILILGAGISGHTVARYLGKWLKSHSITVVSPKPKWNWIPSNIWVGVGEMTEKQVTF	60
Sqn	MHRITIVGSGFAGLTAVQSI-RRTAPDAEITLVSNKAEFIYYPGLIWVPCGIRSGEDLRI	59
	* * * *: *: *: *: * . . . : : . . . *: *: * . . . : : * . * * * : : : : *	

Sqr	ELAPIYKKLGVDVFRQAGAVSIHPEGGAEHNDPYVTIEYTDARAGQTEAVEYDYLVDATG	120
Sqn	DLRPFFKMRMRVRLAGEATGLSPDG-----RTLETTAGP-----VENDGLVIGSG	104
	: * *: *: *: * . . . *: *: * * * * . * * * * . * *	

Sqr	PKLNFGATPGLGPDGGHSLSVCTPDHAKANEHLQKMIAMKAGATKTFVVGTHGMCTC	180
Sqn	GRF-IKKLPGIEH-----AITPCEGIAAAEAIRDRVKAMDGGSIAMGFAGNPNEPSSM	156
	: : : * *: . * * . . * * : : : * . *: . . * . : : *	
Sqr	QG-AAFEEIYNVDHALREAGVRDKGRLIWIISNEYELGDFGMGGVHIHRGGYVTNGKVFAE	239
Sqn	RGGPTEFIFFGMDSQLRKEGRDRFRLHFFTPAERPGNR-LGPKAVDG-----IL	205
	: * . *: *: *: * * *: * * : : . * : * : *	
Sqr	SLMVERGMEWITRAAVSKVEPGKVHYEMLDGSFHEIDFDFAMLIIPFAGQPLKAFDKSGE	299
Sqn	AEMKRRGIETHLGHKLKSFSESKVTTEAG-----EFDADLILFMPGMTGN--TWFDN---	255
	: * . *: * : * * * * * : * * : : : * : : * *	
Sqr	DITSKIFAPNGFMKVDADYEPKPYEDWGPDKDWPKTYQTPLYKNMFVAVG--IAFAPPHLIS	357
Sqn	--TDLPRSPGGLLQADAHCR-----VPGYERVYVAGDSGSGFPDPDWM	296
	* . : * . : : : * * . . . * * : : : * * : * . * . *	

Sqr	KPMKSANGTPINPTPPRTGMPAAIGKAVATSIRDMIKGASAPTQTASMAEIGACVAST	417
Sqn	KQAHMAD-----LQARAANKLLAELQGR-APSETFKVELVCIVDANDT	339
	* : * : . : * . . . : : * * * : * . : : . . . *	

Sqr	GSDIFKGTAATMTVPVVPDYDKYPEYGRMDLTFGEIGLAGHWMKYILHHVFIYQAKLR	477
Sqn	GMLVAR-TEKNNWVLPSTRFF-----HWMKLGFEWWYLRPYR--	375
	* : : * . * : * . : : * * * * . : : : *	
	~~~~~	
Sqr	PGWSMLPD	485
Sqn	-----	
	~~~~~	

2. ábra: *Thiocapsa roseopersicina* Sqr és Sqn fehérje szekvenciájának összehasonlítása, és a fehérjék működésében feltehetően szerepet játszó konzervált aminosavak.

C, **H**: szulfid illetve kinon megkötésében feltehetően szerepet játszó ciszteinek és hisztidinek;

_ : FAD kötő motívumok; ~: C-terminális régió.

3. Célkitűzések

A *Thiocapsa roseopersicina* fototróf bíbor kénbaktérium kén- és hidrogén anyagcseréjének, továbbá az ezen folyamatokban résztvevő enzimek vizsgálata számos kutatás tárgyául szolgál az MTA SZBK Biofizikai Intézetében és az SZTE Biotechnológiai Tanszékén. Tudományos Diákköri munkám során ezekbe a kutatásokba bekapcsolódva, a *T. roseopersicina* szulfid kinon oxidoreduktáz 2 (Sqn) fehérjéjének tanulmányozását tűztem ki célul. Ezen enzim feltételezéseink szerint a sejtek kénanyagcseréjéhez kapcsolódik, azonban működése, illetve sejten belül betöltött pontos szerepe még nem ismert, mivel korábban más mikroorganizmusokban található homológjait sem vizsgálták még részletesen.

Ahhoz, hogy meghatározzam az Sqn fehérje sejten belül betöltött szerepét, szükségem volt a fizikai, biokémiai, továbbá fiziológiai tulajdonságainak meghatározására. Ennek céljából az enzim nagy mennyiségben történő termeltetését és nagy tisztaságban való előállítását kíséreltem meg véghezvinni. Ezt egy, a csoportunk korábbi munkái során előállított rekombináns, affinitás kromatográfiával tisztítható Sqn fehérjét expresszálo törzs felhasználásával terveztem elérni. A fehérje tisztíthatóságának biztosításához nagy térfogatú *T. roseopersicina* kultúrák feldolgozása során kapott membrán frakcióról nátrium-bromiddal történő kezeléssel szándékoztam eltávolítani és oldott állapotba vinni az Sqn fehérjét, amelyeket ezt követően affinitás kromatográfiával terveztem tisztítani.

Célul tűztem ki a tisztított fehérje kofaktor tartalmának vizsgálatát, amit a fehérje abszorpciós spektrumának mérésével terveztem megvalósítani. Bizonyítani szerettem volna az Sqn szulfid függő kinon redukálásban betöltött szerepét, emellett az enzim aktivitásának kinetikai, illetve fiziológiai paramétereit terveztem vizsgálni. Végül célom volt meghatározni az Sqn fehérje sejtbeli elhelyezkedését.

4. Anyagok és módszerek

4.1 *Thiocapsa roseopersicina* tenyésztése

Kísérleteim során az SZTE Biotechnológiai Tanszék korábbi munkái során létrehozott *Thiocapsa roseopersicina* FRNSQNN törzsével dolgoztam. Ezen törzs a vad típusú Sqn enzimet nem, helyett a fehérje N-terminálisán StrepII affinitás peptiddel kiegészített rekombináns változatát expresszálja.

A *T. roseopersicina* növesztése 25-28°C-on, 6-7 napon keresztül folyamatos megvilágítás mellett, anaerob körülményeket biztosító csiszolt dugós Erlenmeyer lombikokban történt. A fehérje tisztítási kísérletekhez szükséges megfelelő mennyiségű *T. roseopersicina* sejt előállítása érdekében nagy térfogatú kultúrákat növesztettem, amelyekhez a sejteket Pfenning féle tápoldatba (PC) oltottam le.

PC tápoldat: 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.

A tápoldathoz adtam továbbá 25 mg/ml koncentrációban kanamicin, streptomycin és gentamicin antibiotikumokat.

4.2 *Thiocapsa roseopersicina* sejtek kezelése

4.2.1 Szferoplaszt előállítás *Thiocapsa roseopersicina* sejtekből

Szferoplaszt előállítás céljából a *T. roseopersicina* kultúrában felnőtt sejteket centrifugálással választottam el a tápoldattól (10 perc, 7000 rpm, 4°C), majd 2 ml Periplazma pufferben (25% szukróz, 80 µl 50 mg/ml lizozim) vettem fel és 30 percig 30 °C-on állni hagytam. Ezt követően hozzáadtam 2 ml jéghideg desztillált

vizet, majd jégen inkubáltam 10 percig, végül centrifugálással (10 perc, 7000 rpm, 4°C) választottam el a szferoplasztokat a periplazma frakciótól.

4.2.2 *Thiocapsa roseopersicina* sejtek feltárása

Nagy mennyiségű fehérje kinyerése érdekében jellemzően 5 liter térfogatú *Thiocapsa roseopersicina* kultúrát dolgoztam fel. Első lépésében centrifugálással választottam el a felnőtt sejteket a tápoldattól (10 perc, 7000 rpm, 4°C), majd 500 ml-nek megfelelő sejtet összesen 6 ml TBS pufferben (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH = 8,0) szuszpendáltam fel.

A sejtek szonikálással történő feltárását Bandelin Sonoplus típusú ultrahangos szonikátorral végeztem VS 70 T szonikáló fejet alkalmazva, 3 perc 20 másodpercig tartó 8 X 15 másodperces szonikálási programot használva. A felmelegedés elkerülése érdekében a feltárás során a sejtmintát jéggel hűtöttem. Ezt követően a sejtfalmaradványokat, a feltáratlan sejteket, továbbá a kénglobulusokat centrifugálással (15 perc, 22600 g, 4°C) távolítottam el, majd az így keletkezett felülúszóval (sejt extraktum) dolgoztam tovább.

4.2.3 Membrán és szolubilis sejtfrakciók elválasztása

A sejtek feltárását követő centrifugálás során kapott felülúszót ultracentrifugálásnak (UC) vetettem alá (Sorvall WX Ultra Series 90 típusú ultracentrifuga, T-1270 típusú rotor, 4°C, 90 perc, 38000 rpm), melynek eredményeként kapott felülúszó a szolubilis sejtfrakciónak felel meg, továbbá az általam későbbiekben használt membrán frakció, melyet 6 ml TBS pufferben felsuszpendáltam és felhasználásig -20°C-on tároltam.

4.3 Fehérje tisztítás és analízis

4.3.1 Fehérje tisztítása affinitás kromatográfiával

A rekombináns Sqn fehérjét affinitás oszlop kromatográfia segítségével tisztítottam. A megfelelő mennyiségű oszloptöltetet gravitációs átfolyású oszlopba töltöttem, majd TBS pufferrel átmostam. A fehérjét tartalmazó mintát Strep-tactin sepharose affinitás oszloptöltettel (IBA) egy órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltam. Ezt követően begyűjtöttem az átfolyó frakciót, majd nyolcszor mostam az oszloptöltetet 2 oszloptérfogatnyi TBS pufferrel. Következő lépésben fél oszloptérfogatnyi elúciós puffert (100 mM Tris-HCl pH = 8,0, 150 mM NaCl, 2,5 mM desztiobiotin) alkalmazva eluáltam a felkötődött fehérjét, melyből 4 frakciót gyűjtöttem, továbbá egy ötödik frakcióban egy oszloptérfogatnyi TBS-el eltávolítottam a maradék fehérjét tartalmazó elúciós puffert. Végül az oszlopot regeneráló oldattal (100 mM Tris-HCl pH = 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM hidroxí-azofenil-benzoidsavval (HABA)) regeneráltam.

4.3.2 Denaturáló poliakrilamid gélelektroforézis

A tisztított fehérjék molekulatömeg szerinti elválasztását nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) végeztem (Sambrook és mts., 1989), melyhez 1,5 mm vastagságú, 10%-os poliakrilamid géleket készítettem. A géleket Tris-glicin puffer rendszerben futtattam.

Elválasztó gél: 1,9 ml H₂O; 1,7 ml 30 % akrilamid - biszakrilamid (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.

Gyűjtő gél: 2,1 ml H₂O; 0,5 ml 30 % akrilamid - biszakrilamid (29:1) keverék; 0,38 ml 1 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 mintákhoz 1 x SDS felvivő puffert adtam, majd 15 perces, 95°C-on történő inkubálást követően feltöltöttem azokat a gélek tetején kialakított zsebekbe. Az elektroforézis TGS pufferben (25 mM Tris, 192 mM glicin, 0,1

% SDS pH = 8,3) eleinte 60 V-on, majd a fehérjéket tartalmazó minta szeparáló gélbe való átjutását követően 120 V-on történt.

A futást követően a gél 1 órán keresztül fixáló oldattal (30 % etanol, 10 % ecetsav) kezeltem, majd a fixáló oldatot desztillált vízzel való többszöri átmosással távolítottam el teljes mértékben. Ezt követően Coomassie blue festékkel (1 literben: 250 ml H₂O, 117,64 ml 85 % foszforsav, 100 g ammónium szulfát, 1,2 g Coomassie blue G250, 200 ml etanol) egy éjszakán át történő festéssel tettem láthatóvá a gélen megjelenő sávokat, végül a felesleges festéket 1% ecetsav segítségével mostam ki a gélből.

4.3.3 Western hibridizáció

Az egyes mintákban lévő fehérje sávokat 10% SDS-PAGE-sel választottam el (futtatási körülmények: 0,5 óra, 60 V-on, majd 1 óra 120V-on), majd nitrocellulóz membránra (AmershamTM HybondTM -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 át blokkoló oldatban tartottam, ezzel megakadályozva a nem-specifikus fehérjék kötődését (blokkoló oldat: 1%-os alacsony zsírtartalmú tejpor feloldva PBST pufferben (115mM NaCl, 16mM Na₂HPO₄, 4mM KH₂PO₄, 0,1% Tween 20, pH = 7,5). A jelölő lépésben ellenanyagként StrepMAB-Classic-HRP ellenanyagot (IBA # 2-1509-001) használtam 1:10000-es hígításban. A detektálás során a membránt 1 percig inkubáltam az Enhancer reagens és hidrogén-peroxid 3 ml térfogatú 1:1 arányú elegyével (Pierce, SuperSignal West Pico Rabbit IgG Detection Kit), majd a kemilumineszcens jelet autoradiográfiásan detektáltam VersaDoc 4000MP (BIO-RAD).

4.4 Tisztított fehérjék vizsgálata

4.4.1 Fehérje mennyiségi meghatározása Micro-Lowry módszerrel

A tisztított fehérje koncentrációját Micro-Lowry módszerrel határoztam meg, 0 µg/µl, 5 µg/µl, 10 µg/µl, 25 µg/µl és 50 µg/µl koncentrációjú borjú szérum albumin (BSA) oldatsorozattal készített kalibrációhoz történő viszonyítással.

A különböző koncentrációjú BSA illetve meghatározandó fehérje oldatokat 100 µl végtérfogatban készítettem el, majd 800 µl 0,25 M nátrium-hidroxid oldatot adtam hozzájuk. 20 perc szobahőmérsékleten történő inkubálást követően 300 µl C reagenst mértem a reakcióelegyekbe, majd újabb 15 perces inkubálást követően 100 µl D reagenssel egészítettem ki azokat. 30 perc elteltével mértem az oldat fényelnyelését 750 nm-en 1 cm fényúttal rendelkező műanyag küvettában BIORAD SmartSmec Plus típusú spektrofotométerben (Yeang és mts., 1998).

A reagens: 6% nátrium-karbonát

B reagens: 1,5% réz-szulfát

3% nátrium-citrát

C reagens: A reagens + B reagens (1:50)

D reagens: 72% Folin-reagens

4.4.2 Fehérje abszorpciós spektrumának meghatározása

Az affinitás kromatográfia során begyűjtött elúciós frakciók abszorpciós spektrumát Thermo Evolution 300 UV-Visible típusú spektrofotométerben vettem fel. A mintából 400 µl mennyiséget 1 cm fényúttal rendelkező kvarcküvettába mértem, a tisztított fehérjék fényelnyelését 250-800 nm hullámhosszúságú tartományban vizsgáltam.

4.4.3 Fehérje szulfid függő kinon redukáló aktivitásának mérése

A tisztított rekombináns Sqn fehérje szulfid függő kinon redukáló aktivitását *in vitro* körülmények között vizsgáltam durokinon illetve decilubikinon alkalmazásával. Az aktivitás mérő reakcióelegyet egy 1 cm fényúttal rendelkező anaerobizálható kvarcküvetében állítottam össze 1 ml végtérfogatban. Az általánosan használt reakcióelegy 50 mM Tris-HCl puffert (pH = 7,5), 200 μ M nátrium-szulfidot, 50 μ M kinont, valamint 2 μ g tisztított Sqn enzimet tartalmazott. A mérés megkezdése előtt a reakcióelegyeket 5 perces nitrogén gázos átfúvatással anaerobizáltam. Az enzimreakciókat a nátrium-szulfid szubsztrát bemérésével indítottam, a méréseket 25°C-on végeztem. A minták fényelnyelésének időbeni változását Thermo Evolution 300 UV-Visible spektrofotométer segítségével követtem nyomon az alkalmazott kinon elnyelési maximumának megfelelő hullámhosszon (durokinon: 270 nm, decilubikinon: 293 nm).

4.4.4 Tisztított fehérje flavin csoport tartalmának vizsgálata

100 μ l tisztított Sqn fehérjét tartalmazó mintát 400 μ l 99,5%-os metanollal egészítettem ki. Ezzel párhuzamosan pozitív kontrollként olyan FAD tartalmú oldatot készítettem 100 μ l végtérfogatban, melynek koncentrációja megegyezett az elúciós frakció fehérje koncentrációjával, majd ehhez is hozzáadtam 400 μ l metanolt. Mindkét mintát forrásban lévő vízbe helyeztem 10 percre, majd jégre tettem. Ezt követően a kicsapódott fehérjéket lecentrifugáltam (4°C, 15 perc, 13000 rpm), majd Thermo Evolution 300 UV-Visible típusú spektrofotométerben mértem a felülúszók fényelnyelését 1 cm fényúttal rendelkező kvarcküvetében 300-600 nm tartományban.

5. Eredmények és megvitatásuk

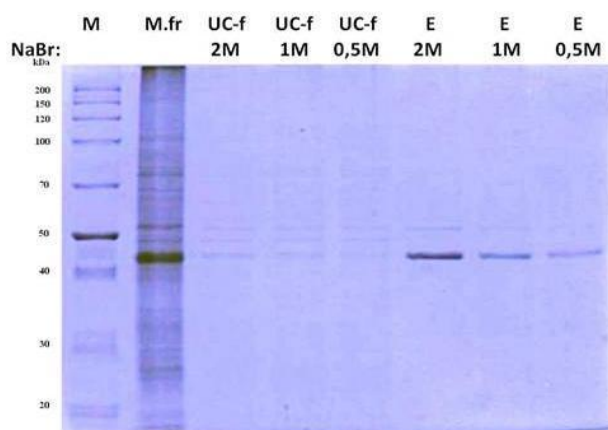
5.1 Rekombináns szulfid kinon oxidoreduktáz 2 fehérje tisztítása *Thiocapsa roseopersicina*-ból

Laboratóriumunkban folytatott korábbi munkák során létre lett hozva egy olyan *T. roseopersicina* törzs (FRNSQNN), amely N-terminálisán StrepII affinitás peptiddel fuzionáltatott Sqn fehérje termelésére képes. A tisztítására irányuló vizsgálatok során kiderült, hogy az Sqn egy membrán asszociált fehérje. Sikerült egy olyan módszert kidolgozni, amellyel a rekombináns Sqn-t termelő *T. roseopersicina* sejtekből előállított membrán frakcióból N,N-Dimetildodecilamin-N-oxid (LDAO) és N-dodecil- β -D-maltozid (DDM) detergenssekkel történő szolubilizálást követően affinitás kromatográfiával tisztítható a fehérje. Ez a technika eredményesnek bizonyult, azonban a detergens alkalmazásával történő tisztításnak több hátránya is van. Amellett, hogy az anyagok meglehetősen drágák, a fehérjékkel történő későbbi vizsgálatokat, mint például az aktivitásukat befolyásolhatják, és ebben az esetben a rendszerből való eltávolításuk igen körülményes.

Az Sqn biokémiai vizsgálatának megvalósítása érdekében egy olyan tisztítási eljárás kidolgozását tűztem ki célul, amellyel nagy mennyiségű és koncentrációjú, a tervezett vizsgálatokat esetlegesen zavaró pigment szennyeződésektől mentes, nagy tisztaságú fehérje minták állíthatók elő. Ezért az Sqn fehérjék membránból történő felszabadítása és oldhatóvá tétele céljából a magas koncentrációjú nátrium-bromid alkalmazhatóságát vizsgáltam meg, mivel ezzel a módszerrel az irodalom szerint *Rhodobacter capsulatus* mikroorganizmusban található, az Sqn fehérjével nagyfokú homológiát mutató Sqr enzimet már sikerrel szolubilizálták (Schütz és mts., 1997, Shahak és mts., 1992). A membrán frakció magas koncentrációjú nátrium-bromidos kezelése során az alkalmazott vegyület kaotróp szerként viselkedik, amely a fehérje körül hidrofób környezetet biztosít, így lehetővé teszi a membrán frakciótól való elválását.

Az irodalmi adatokból kiindulva a *T. roseopersicina* membrán frakciót 2M NaBr-al kezeltem, emellett 1M illetve 0,5M koncentrációban is alkalmaztam az Sqn szolubilizáláshoz minimálisan szükséges sókoncentráció meghatározásának céljából.

Ezt követően 200 ml sejt kultúrából származó membrán frakció kezelését követő ultracentrifugálás során kapott felülúszóból affinitás kromatográfia segítségével kíséreltem meg tisztítani a rekombináns Sqn fehérjét. A tisztítás során kinyert elúciós frakciók fehérjetartalmát SDS-PAGE-el vizsgáltam, melyen jól látható az Sqn fehérjének megfelelő 44 kDa méretű sáv (3. ábra). Látható, hogy a NaBr koncentrációjának növelésével növekszik az elúciós frakciók fehérjetartalma. Ezért úgy döntöttem, hogy a 2M NaBr alkalmazása mellett kísérlem meg az Sqn fehérje nagy mennyiségben való tisztítását.



3. ábra: Sqn tisztítása különböző koncentrációjú NaBr-al kezelt membrán frakcióból. M: marker; M.fr: membrán frakció; UC-f: ultracentrifugálás után kapott felülúszó; E: elúciós frakció.

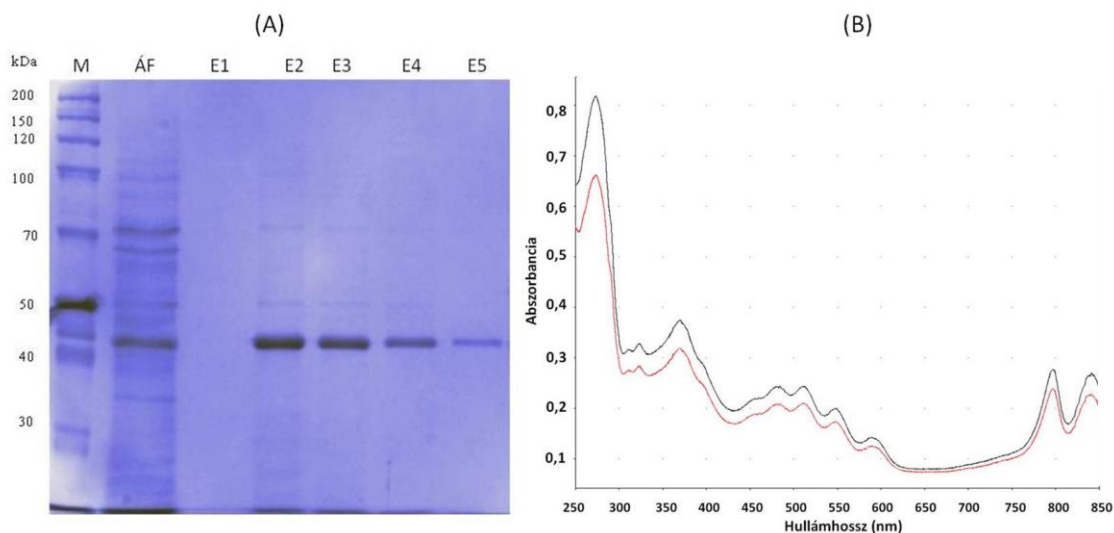
Az Sqn nagy léptékű tisztítását a kiindulási kultúra mennyiségének megnövelésével kívántam elérni, ezért 2 liter *T. roseopersicina* kultúrából létrehozott membrán frakciót kezeltem 2M NaBr-al. Azt tapasztaltam, hogy a kiindulási sejtmennyiség megnövelése pigmentek megjelenését okozta a NaBr-os kezelés után kapott felülúszó mintában (4. ábra).



4. ábra: A membrán frakció 2M NaBr kezelését követő ultracentrifugálás után kapott felülúszó és csapadék.

A felülúszóból affinitás kromatográfiával tisztítottam az Sqn fehérjét, majd az elúciós frakciók fehérje tartalmát SDS-PAGE-el vizsgáltam (5. ábra/A). Irodalmi adatokból tudjuk, hogy a szulfid kinon oxidoreduktázok flavin csoporttal rendelkező

enzimek. Ezen megállapítást az Sqn esetében abszorbancia spektrumának meghatározásával kívántam igazolni, melyet az tett lehetővé, hogy a megfelelő tisztaságú fehérje abszorpciós spektrumában 450 és 480 nm-en a flavin kofaktorra jellemző elnyelési csúcsok jelennek meg. Bár a gélképen nem látható számottevő mennyiségű nem specifikus fehérjére utaló szennyezés, a tisztított fehérjét tartalmazó elúciós frakciók spektrumában a *T. roseopersicina* membránjára – köztük a 798 nm-en elnyelési maximummal rendelkező bakterioklorofillra – jellemző elnyelési csúcsok jelentek meg (5. ábra/B). Ennek oka lehet, hogy a magas koncentrációban alkalmazott NaBr-os kezelés során olyan membrándarabok is kiszakadnak a sejtmembránból, melyek a StrepII affinitás peptiddel jelölt Sqn fehérjét, továbbá más, nem specifikus membrán fehérjét, köztük a fotoszintetikus rendszer pigment tartalmú fehérjéit is tartalmazzák. Ezek a membrán darabok kis méretük következtében az ultracentrifugálás során a felülúszóban maradnak, majd az ezt követő fehérje tisztítás során felkötődnek az affinitás kromatográfiás oszlopra. Végül a nagy mennyiségű, membránból felszabadított Sqn enzimet is tartalmazó mintákba kerülnek, amellyel az elúciós frakció fehérjékkel és fotoszintetikus pigmentekkel való szennyeződését okozza.



5. ábra: (A): Sqn tisztítás 2M NaBr-al kezelt membrán frakcióból. M: marker; ÁF: a tisztítás során az oszlopra fel nem kötődött fehérjét tartalmazó átfolyó frakció; E1-5: elúciós frakciók.

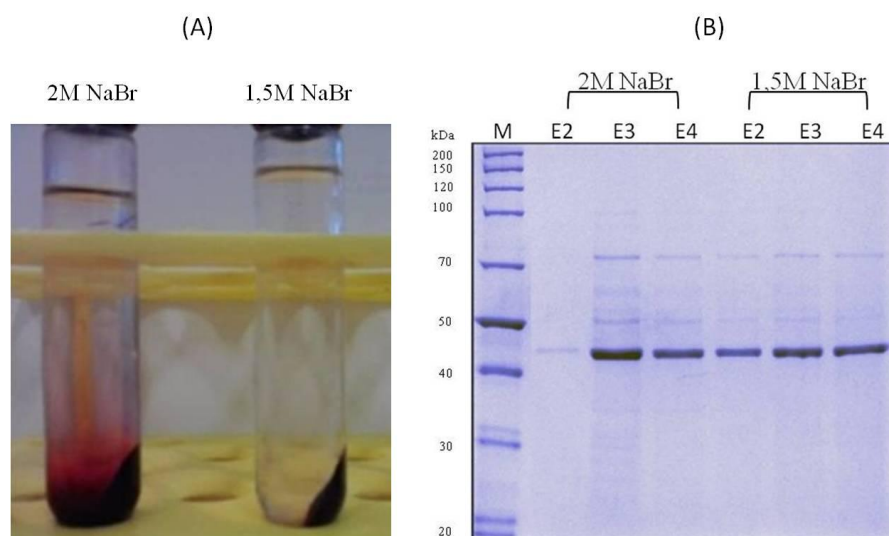
(B): A második és harmadik elúciós frakciók abszorpciós spektruma.

Következő lépésben a kellő tisztaságú fehérje kinyerése céljából csökkentettem a NaBr koncentrációját 2M-ról 1,5M-ra annak reményében, hogy ezen koncentráció alkalmazásával a tisztított Sqn pigmentekkel és nem specifikus fehérjékkel való

szennyezettsége visszaesik. Ezen felül a membránkezelést követő ultracentrifugálás során a mintára gyakorolt átlagos centrifugális erőt 150000 g-ról 200000 g-re növeltem, továbbá a centrifugálás idejét 2 órára emeltem. A megváltoztatott paraméterek alkalmazásától azt vártam, hogy az esetlegesen képződő membrándarabok az ultracentrifugálás során hatékonyabban leülepednek a csapadék frakcióba.

Ezekkel a változtatásokkal sikerült elérnem a kívánt eredményt, vagyis az ultracentrifugálás során kapott felülúszó, melyből később a fehérjét tisztítottam, pigmentmentes lett (6. ábra/A).

A felülúszók fehérjetartalmát SDS-PAGE-el vizsgáltam, melyen látszik, hogy a kétféle módon kezelt membrán frakcióból közel azonos összmenyiségű, ám a 1,5 M NaBr-al való kezelés esetében tisztább fehérjét sikerült izolálnom (6. ábra/B).

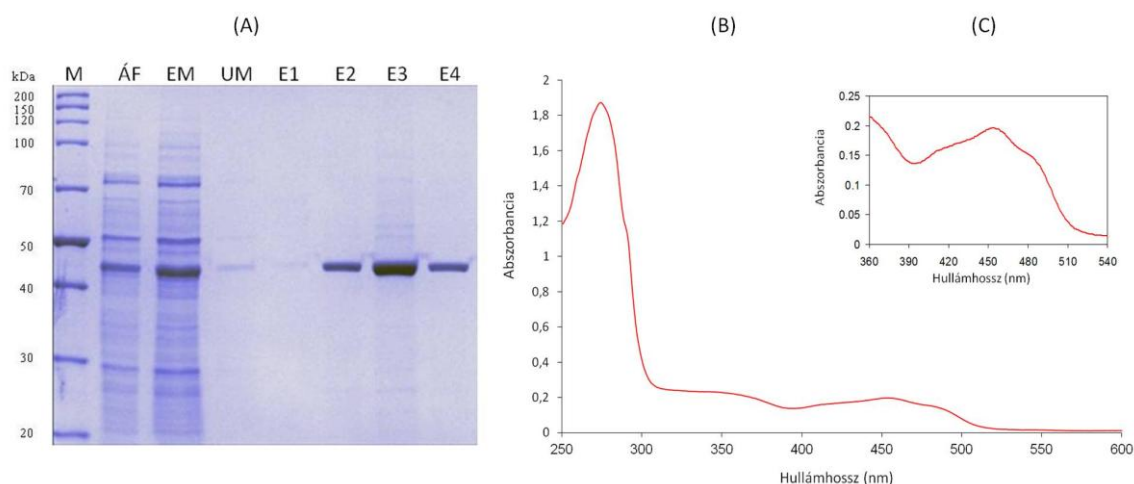


6. ábra: (A): a membrán frakciók különböző koncentrációjú NaBr-os kezelését követő ultracentrifugálást követően kapott felülúszók és csapadékok.

(B): Sqn tisztítás különböző koncentrációjú NaBr-al kezelt membrán frakciókból.

M: marker; E2-4: elúciós frakciók.

Az előbb bemutatott kísérletemmel a megfelelő tisztaságú fehérje kinyeréséhez szükséges, a feldolgozás során alkalmazott paramétereket határoztam meg. Következő lépésben az Sqn nagy mennyiségben való tisztítását tűztem ki célul, mely során 5 liter *T. roseopersicina* kultúrát növesztettem és dolgoztam fel. A kísérlet eredményességét SDS-PAGE-el ellenőriztem, amely bizonyította a nagy mennyiségű Sqn jelenlétét az elúciós frakciókban (7. ábra/A).



7. ábra: (A): Nagy mennyiségű Sqn tisztítása 1,5M NaBr-al kezelt membrán frakcióból. M: marker; ÁF: a tisztítás során az oszlopra fel nem kötődött fehérjéket tartalmazó átfolyó frakció; EM: első mosó frakció; UM: utolsó mosó frakció; E1-4: elúciós frakciók.

(B): Tisztított Sqn fehérjét tartalmazó harmadik elúciós frakció abszorpciós spektruma.

(C): Flavin kofaktor jelenlétére utaló elnyelési csúcsok az Sqn fehérje abszorpciós spektrumában.

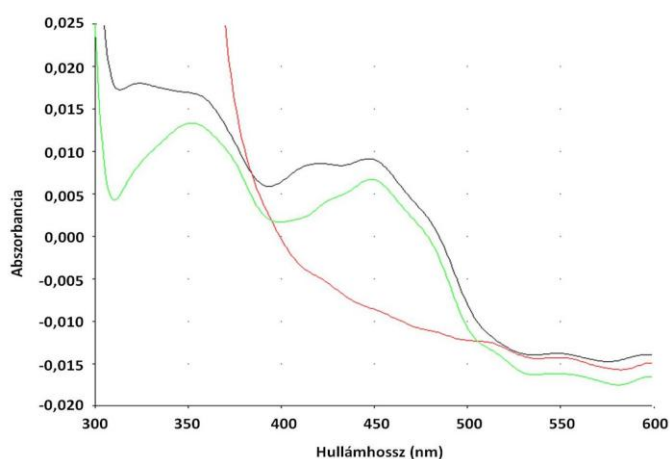
Elmondható, hogy ebben a fehérje tisztítási kísérletben a nagy mennyiségű kiindulási kultúrának, a NaBr koncentráció csökkentésének, továbbá a centrifugálási hatékonyság növelésének köszönhetően sikerült nagy mennyiségben és tiszta formában fehérjét tisztítanom. Micro-Lowry módszerrel meghatároztam, hogy a harmadik elúciós frakció (E3) 0,92 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ koncentrációban tartalmaz tisztított fehérjét. Megvizsgáltam továbbá a tisztított fehérje abszorpciós spektrumát, melyen látszik, hogy a fehérje minta pigmentektől teljes mértékben mentes (7. ábra/B). A kidolgozott új eljárással tisztított Sqn fehérje abszorpciós spektruma a fehérje magas koncentrációjának és tisztaságának köszönhetően jól vizsgálható. Az abszorpciós spektrumban egyértelműen azonosíthatók 450 és 480 nm-en az oxidált flavin kofaktort tartalmazó fehérjékre jellemző elnyelési csúcsok (7. ábra/C).

5.2 Szulfid kinon reduktáz 2 fehérje abszorpciós spektrumának vizsgálata

A *T. roseopersicina* Sqn fehérjéjének szekvenciájában azonosított FAD kötő motívumok alapján feltételezhető volt, hogy az Sqn egy flavoprotein, amit a tisztított rekombináns fehérje abszorpciós spektrumában 450 és 480 nm-en megjelenő csúcsok bizonyítottak (8. ábra). Ezt követően megvizsgáltam, hogy a fehérjéhez kapcsolódó flavin csoport részt tud-e venni redox folyamatokban, tehát funkcionális-e?

Az oxidált fehérjében lévő flavin csoport redukálását az enzim mintához adott erős redukálószer, Na-ditionit segítségével kíséreltem meg. Ennek hatását a fehérje abszorpciós spektrumában bekövetkező változások nyomon követésével vizsgáltam.

A redukálószer hatására a fehérje abszorpciós spektruma megváltozott: az oxidált flavoproteinekre jellemző elnyelési maximumok lecsökkentek a redukálódott flavin csoportot tartalmazó fehérjékre jellemző módon (8. ábra). A következő lépésben megvizsgáltam, hogy a Na-ditionittal elredukált fehérjéhez kinont – ebben az esetben durokinont (DQ) – adva a fehérje képes-e visszaoxidálódni. A durokinon hozzáadást követően az Sqn fehérjeminta abszorpciós spektrumában újra megjelentek az oxidált flavoproteinekre jellemző csúcsok jelezve, hogy az Sqn fehérjék képesek a felvett elektronokat átadni a durokinonnak. A folyamat végeredményeként az összes fehérje újra oxidált állapotú lett (8. ábra).



8. ábra: A tisztított oxidált Sqn fehérje (fekete), a Na-ditionittal redukált fehérje (piros) valamint a durokinonnal visszaoxidált fehérje (zöld) abszorpciós spektruma.

Ezzel a kísérlettel igazoltam, hogy az Sqn enzim egy redox aktív, funkcionális flavin csoportot tartalmaz, mely Na-ditionit hozzáadása során elredukálódik, és képes

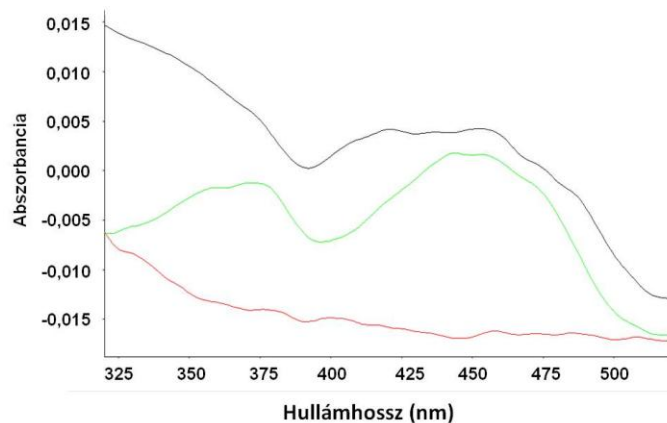
továbbadni a megszerzett elektronokat egy alkalmas elektronakceptor – ebben az esetben durokinon – molekuláknak.

5.3 Szulfid kinon reduktáz 2 fehérje flavin csoport tartalmának vizsgálata

A tisztított Sqn fehérje által tartalmazott flavin csoport azonosítását vékonyréteg kromatográfiával kívántam elérni. Ehhez szükségem volt a flavin csoport Sqn enzimből való kivonására, melyet a fehérje forrásban lévő metanolban történő denaturálásával szerettem volna megvalósítani, amire abban az esetben van lehetőség, ha a flavin kofaktor nem kovalensen kötődik a fehérjéhez.

A forrásban lévő metanolban inkubált Sqn mintát a kezelést követően lecentrifugáltam, és az így kapott felülúszó abszorpciós spektrumát mértem, amit összehasonlítottam a fehérjével azonos koncentrációjú és azonos módon kezelt FAD oldat abszorpciós spektrumával (9. ábra). Irodalmi adatokból tudjuk, hogy a szulfid kinon oxidoreduktáz típusú enzimekben a flavin csoport, mely általában FAD, kétféleképpen kapcsolódhat a fehérjéhez: kovalens vagy nem kovalens kötással. Ezért azt vártam, hogy ha a fehérjében található flavin csoport nem kovalensen kötött, akkor elválik a metanos forralás következtében denaturálódott fehérjétől és átkerül a felülúszó frakcióba, így a felülúszó a kontroll FAD mintával megegyező abszorpciós spektrummal fog rendelkezni. Azonban ha a kofaktor kovalensen kötött, akkor a kontrollhoz képest nem lesz fényelnyelése a felülúszó mintának, mivel ebben az esetben a forralás hatására denaturálódott majd lecentrifugált fehérjéből nem szabadul fel flavin molekula.

Azt az eredményt kaptam, hogy a FAD-ra jellemző 365 és 450 nm-es elnyelési csúcsok a kezelt fehérje felülúszójában nem jelentek meg, továbbá a forralást követő centrifugálással kapott fehérje csapadék sárgás elszíneződést mutatott. Az eredmények arra utaltak, hogy a flavin csoport nem került át a felülúszóba, hanem a denaturálódott fehérjével együtt kicsapódott, amiből arra következtettem, hogy az Sqn-ben található kofaktor kovalensen kötött formában van jelen. Mivel az alkalmazott módszerrel a kofaktor nem volt felszabadítható az Sqn fehérjéből a flavin csoport pontos meghatározását nem tudtam megvalósítani.



9. ábra: Az Sqn flavin csoport tartalmának vizsgálata során kapott FAD kontroll oldat (zöld) és fehérje minta (piros) felülúszójának, továbbá kezeletlen enzimet tartalmazó elúciós frakció (kék) abszorpciós spektruma.

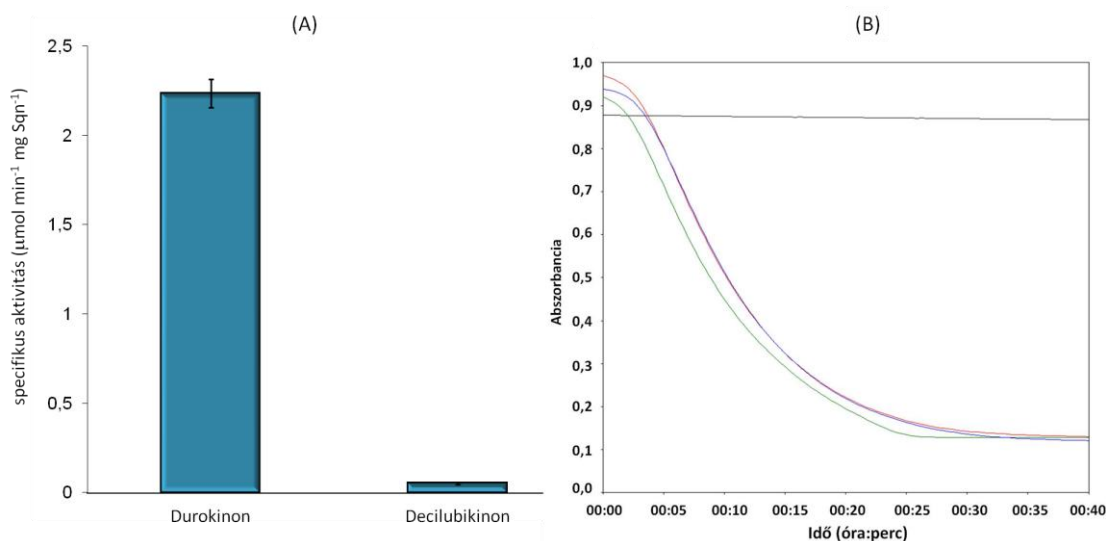
5.4 Szulfid kinon oxidoreduktáz 2 fehérje aktivitásának meghatározása

Miután igazoltam a tisztított rekombináns Sqn aktív flavin csoport tartalmát, meghatároztam, hogy az enzim milyen reakció katalizálásába játszik szerepet. Vizsgáltam, hogy a tisztított Sqn képes-e szulfid jelenlétében a NAD^+ , a NADP^+ , vagy citokróm c fehérjéket elredukálni, ám ezekre negatív eredményt kaptam.

Ezt követően megvizsgáltam az enzim szulfid függő kinon redukáló aktivitását, melyhez az irodalom szerint a szulfid kinon oxidoreduktáz enzimek aktivitásának mérése során gyakran alkalmazott decilubikinon (dUQ), továbbá durokinon (DQ) szubsztrátot használtam.

Az enzimreakció elegyeket az Anyagok és módszerek fejezetben ismertetett módon állítottam össze. Az enzimminta szulfid függő kinon redukáló aktivitásának mérését $50 \mu\text{M}$ koncentrációban alkalmazott kinon szubsztrátok redukáltsági szintjének fotometrális úton való követésével valósítottam meg. Ezt a maximális fényelnyelési hullámhosszon végeztem, dUQ esetében 293 nm , a DQ alkalmazása során pedig 270 nm hullámhosszon.

A kétféle kinonnal végzett aktivitás mérési kísérletek eredményeül azt kaptam, hogy az Sqn enzim képes szulfid jelenlétéhez kötötten mindkét kinon redukcióját katalizálni. Az enzim durokinon redukáló aktivitása körülbelül 50-szer magasabb, mint a decilubikinon szubsztrát alkalmazása esetén mérhető aktivitása, ami alapján a durokinon az alkalmasabb mesterséges kinon szubsztrát az enzim aktivitásának meghatározására (10. ábra/A, B).



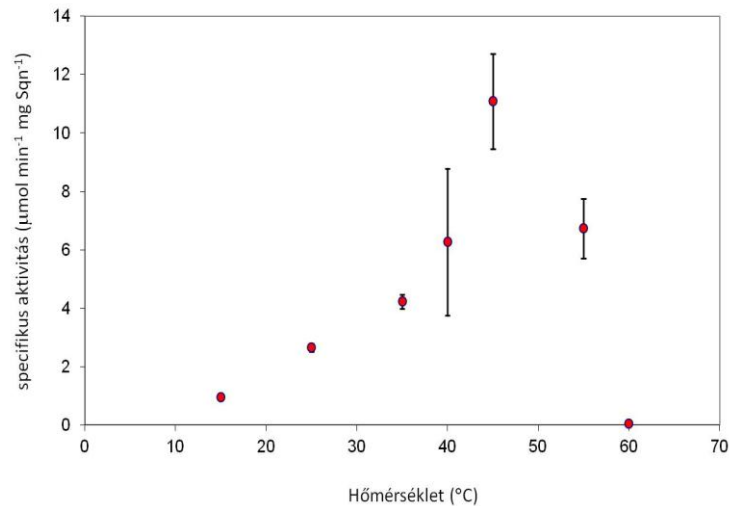
10. ábra: (A): Sqn specifikus aktivitása durokinon illetve decilubikinin szubsztrát alkalmazása esetében. (B): Az Sqn szulfid függő durokinon redukáló aktivitása. Fekete vonal: enzimmentes szulfid függő durokinon redukáló reakció; Színes vonalak: párhuzamosan mért enzim katalizált durokinon redukáló reakciók.

5.4.1 Szulfid kinon oxidoreduktáz 2 fehérje aktivitásának hőmérséklet függése

Az Sqn aktivitásának hőmérséklet függését 15-60°C hőmérséklet tartományban vizsgáltam egy termosztálható mintatartójú spektrofotométer segítségével, melybe a mérés megkezdését megelőzően a reakcióelegyeket 5 percen keresztül előinkubáltam a mérési hőmérsékleten.

A méréssorozat eredménye azt mutatja, hogy a *T. roseopersicina* Sqn enzimének maximális aktivitása 45°C-on van, és 60°C-on már nem képes a szulfid függő kinon redukció katalizálására (11. ábra).

Az ezt követő biokémiai méréseket a *T. roseopersicina* sejtek optimális növesztési hőmérsékletének megfelelő 25°C-on végeztem, annak érdekében, hogy az enzim működésének jellemzőit a fiziológiás viszonyoknak megfelelő körülmények közt határozzam meg.

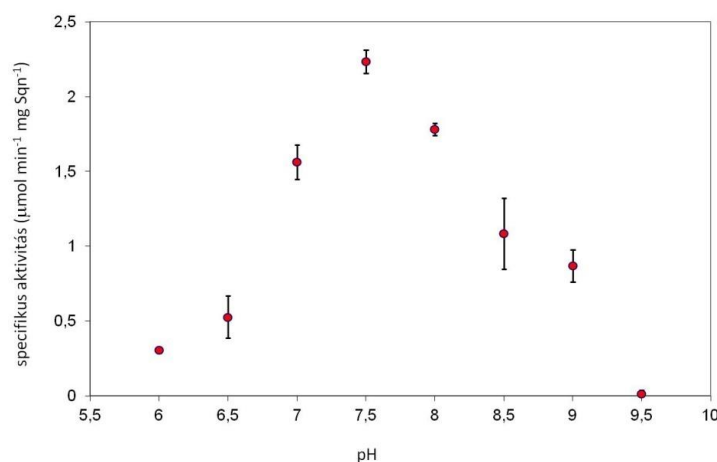


11. ábra: Az Sqn specifikus aktivitásának hőmérséklet függése

5.4.2 Szulfid kinon oxidoreduktáz 2 fehérje aktivitásának pH függése

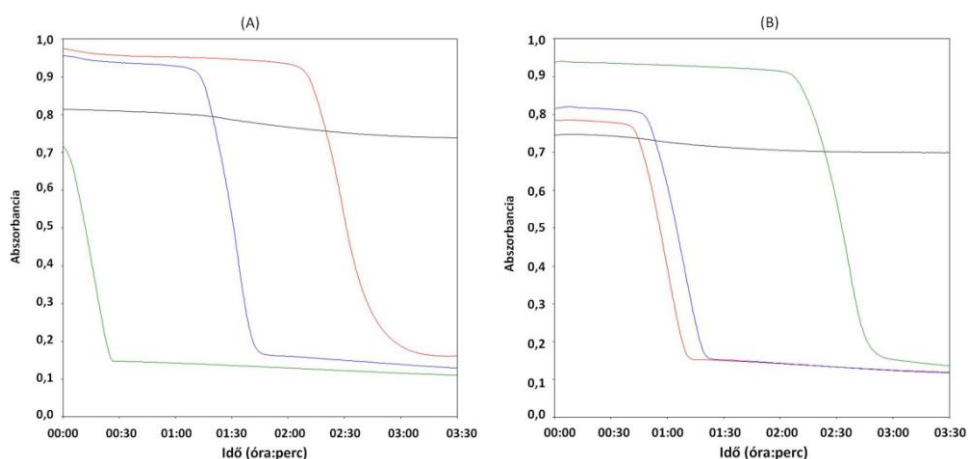
Miután meghatároztam az Sqn szulfid függő durokinon redukáló aktivitásának hőmérséklet függését, vizsgáltam a reakcióelegy pH-jának enzimaktivitásra gyakorolt hatását pH = 6 – 9,5 tartományban. Az irodalom szerint a különböző mikroorganizmusokban megtalálható szulfid kinon oxidoreduktáz enzimek pH optimuma a neutrális pH felett, enyhén lúgos környezetben található pH 7 és 8 között.

A *T. roseopersicina* Sqn enzim pH = 7,5-nél bizonyult a legaktívabbnak, amely eredmény megegyezik az irodalomban leírt szulfid kinon oxidoreduktáz enzimaktivitásra jellemző pH optimummal (12. ábra).



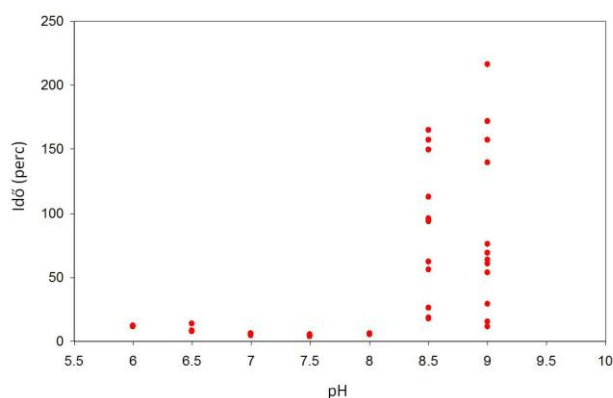
12. ábra: Az Sqn specifikus aktivitásának pH függése.

A $\text{pH} = 8,5$ és $\text{pH} = 9$ paraméteren történt aktivitásmérések esetében az enzimreakciók maximális sebességének eléréséhez szükséges időben nagyfokú eltéréseket tapasztaltam (13. ábra). Magas pH -án az enzimreakciók különböző hosszúságú „lag” fázisok után indultak el. Ezt követően azonban a reakciók maximális sebessége nagy hasonlóságot mutat.



13. ábra: Sqn aktivitás kinetikája magas pH -jú reakcióelegyekben (A): $\text{pH} = 8,5$; (B): $\text{pH} = 9$.

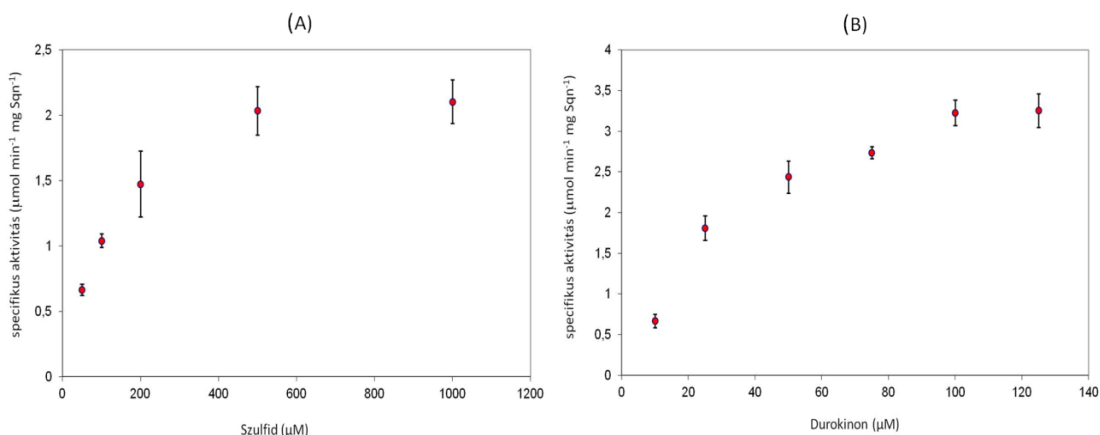
Az aktivitásmérés kezdetétől a maximális reakciósebesség eléréséig tartó idő hosszúsága véletlenszerűen változik az azonos összetételű reakcióminták esetében (14. ábra). Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy az Sqn enzimnek valószínűleg aktiválódnia kell a katalitikus folyamat elindulásához. A „lag” fázis hosszát esetlegesen befolyásoló hatások azonosítása és jellemzése információkkal szolgálhat az Sqn enzim működési mechanizmusáról. Ezen jelenség megértése céljából további vizsgálatokat tervezünk a jövőben.



14. ábra: Az Sqn enzim által katalizált szulfid függő durokinon redukáló reakció maximális sebességének eléréséhez szükséges idő különböző pH -jú reakcióelegyekben.

5.4.3 Szulfid kinon oxidoreduktáz 2 fehérje aktivitásának enzimkinetikai jellemzői

Az Sqn fehérje fiziológiás funkciójának feltárása érdekében meghatároztam a szulfid függő durokinon redukáló aktivitásának enzimkinetikai paramétereit. Ehhez mértem az enzim aktivitásának a szubsztrátok koncentrációjától való függését. (15. ábra).



15. ábra: Sqn specifikus aktivitásának (A): szulfid illetve (B): durokinon koncentráció függése.

Az egyes szubsztrátokra vonatkozó enzimkinetikai paramétereket a különböző szubsztrát koncentrációk esetében meghatározott specifikus reakciósebességek felhasználásával, dupla reciprok módszerrel számítottam ki (1. táblázat).

szubsztrát	V _{max} (µmol/perc)	K _M (µM)
szulfid	2,48	136
durokinon	6,14	79

1. táblázat: Az Sqn egyes szubsztrátokra vonatkoztatott enzimkinetikai paramétereit.

Az Sqn enzim szulfid szubsztrátjának K_M értéke körülbelül egy nagyságrenddel nagyobb más mikroorganizmusok irodalomból ismert szulfid kinon oxidoreduktázainak hasonló adataihoz viszonyítva (2. táblázat). A *T. roseopersicina* Sqn enzime így számottevően alacsonyabb affinitással rendelkezik a szulfiddal szemben, mint az Sqr

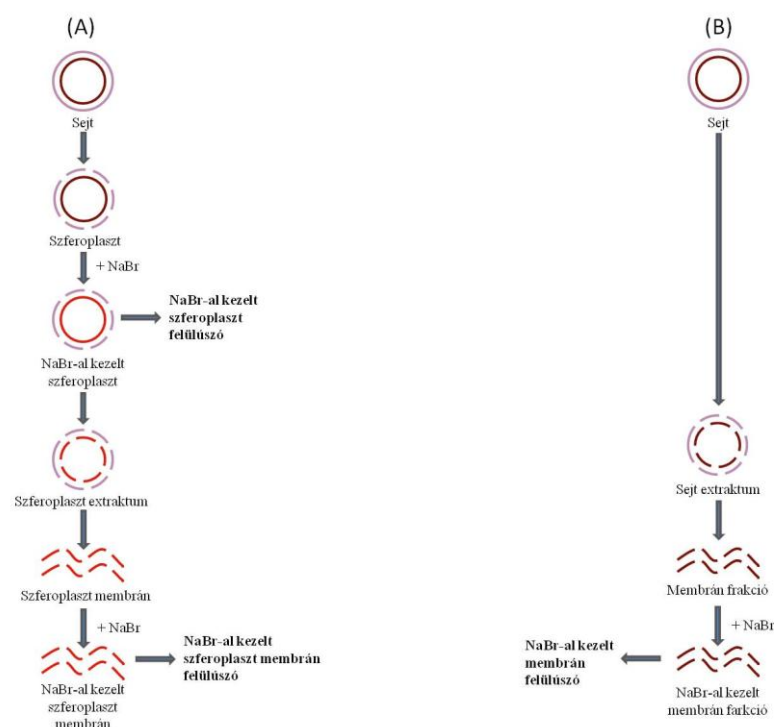
enzimek, ami alapján arra lehet következtetni, hogy az Sqn enzimnek magas szulfid koncentrációjú környezetben lévő sejtekben lehet szerepe a szulfid oxidációban.

Fajok	K _M (μM)	Hivatkozás
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	42	(Wakai és mts., 2007)
<i>Aquifex aeolicus</i>	11	(Nübel és mts., 2000)
<i>Arenicola marina</i>	23	(Theissen és Martin, 2008)
<i>Oscillatoria limnetica</i>	8	(Nübel és mts., 2000)
<i>Paracoccus denitrificans</i>	26	(Schütz és mts., 1998)
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	5	(Nübel és mts., 2000)

2. táblázat: Különböző mikroorganizmusok Sqr enzimeinek szulfid szubsztrátra vonatkozó K_M értéke.

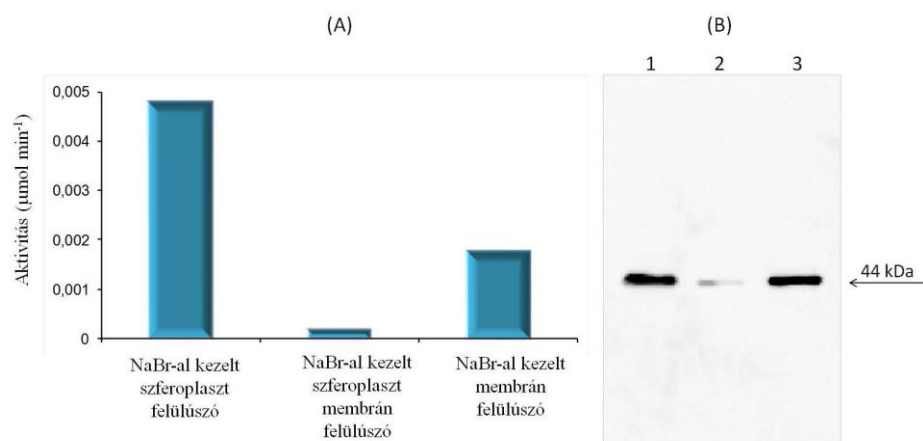
5.5 Az Sqn sejten belüli elhelyezkedésének vizsgálata *Thiocapsa roseopersicina*-ban

Az irodalomból ismert szulfid kinon reduktáz enzimek a sejtmembrán periplazmatikus felszínéhez kötötten helyezkednek el, ezért feltételeztem, hogy az Sqn is hasonló sejtbeli elhelyezkedésű enzim. Ennek vizsgálatát az tette lehetővé, hogy az Sqn fehérje 1,5M NaBr-al történő kezeléssel eltávolítható a *T. roseopersicina* sejtmembránjáról. A kísérletben a szokásostól eltérő módon dolgoztam fel a *T. roseopersicina* sejteket (16. ábra): megfelelő kezeléssel szferoplasztokat állítottam elő belőlük, amiket 1,5M NaBr oldatban inkubáltam, mellyel elértem, hogy ebben az esetben csak a sejtmembrán periplazmatikus oldalához kapcsolódó fehérjék szabaduljanak fel a kezelés hatására. A szferoplasztok szonikálással történő feltárását követően előállított membrán frakciót szintén kezeltem 1,5 M NaBr-al. Párhuzamosan nem szferoplasztizált sejtekből származó membrán frakciót is készítettem, amit szintén, a korábban ismertetett módon NaBr-al kezeltem. A kezeléseket során a sejtmembránokról eltávolított fehérjéket tartalmazó felülúszó minták szulfid függő kinon redukáló aktivitását meghatároztam (17. ábra/A), valamint Western analízissel vizsgáltam azok rekombináns Sqn fehérje tartalmát (17. ábra/B).



16. ábra: (A): Az Sqn enzim sejtbeli elhelyezkedésének vizsgálatához szükséges minták előállítása.
(B): Nem sferoplasztizált sejtek kezelésének menete.

A vártnak megfelelő eredményt kaptam, miszerint az Sqn aktivitása a NaBr-al kezelt sferoplaszt felülűszőben volt a legmagasabb, azaz a sejtmembrán periplazma felőli oldalának NaBr-os kezelése során szabadult fel a membránból a legtöbb szulfid függő kinon redukáló aktivitással rendelkező fehérje (17. ábra/A).



17. ábra: (A): Az Sqn szulfid függő kinon redukáló aktivitásának mérése *Thiocapsa roseopersicina* sejtek különböző frakcióiban.
(B): Sqn enzim jelenlétének vizsgálata a különböző sejtfrakciókban Western hibridizációs kísérlettel.

A Western hibridizációs kísérlet igazolta, hogy – az aktivitás mérések eredményeivel összhangban – a legtöbb Sqn fehérje valóban a NaBr-al kezelt szferoplaszt felülúszó mintájában található (17. ábra/B, 1). A NaBr-al kezelt szferoplasztokból készített membrán frakcióról egy újabb NaBr-al végzett kezeléssel lemosott fehérjék mintájában csak kis mennyiségű Sqn van (17. ábra/B, 2). Kontrollként a teljes sejt membrán frakciójának NaBr-al való kezelése során kapott felülúszót használtam (17. ábra/B, 3).

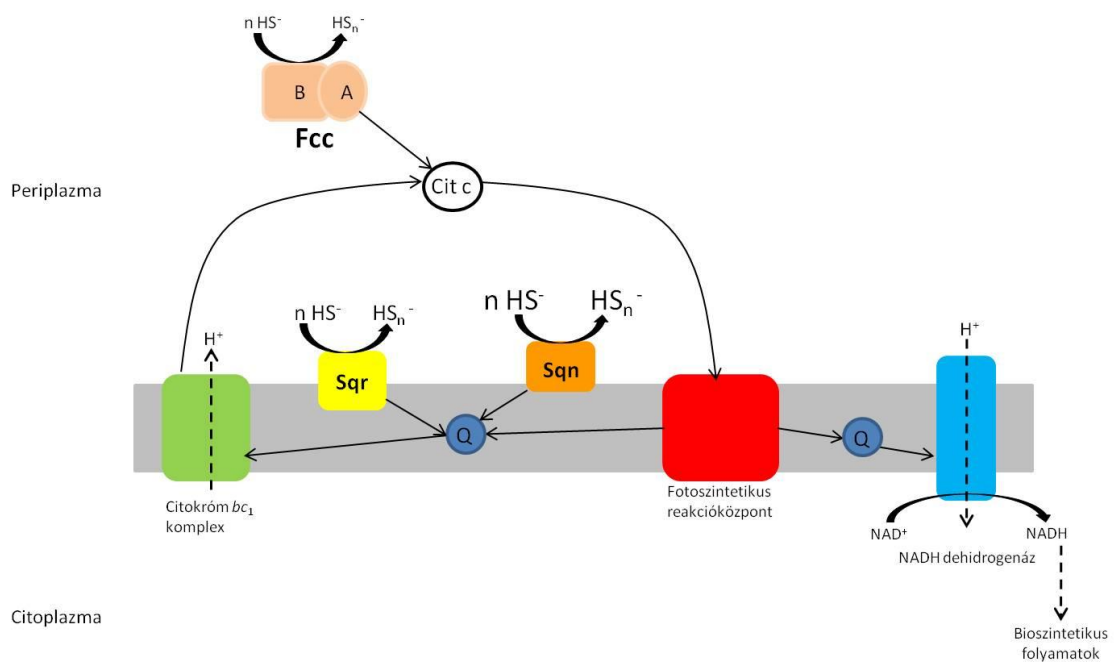
Ezen eredmények megfelelnek annak a feltevésnek, hogy az Sqn enzim a *T. roseopersicina* sejtekben a sejtmembrán periplazma felőli oldalához kötődve helyezkedik el.

6. Összefoglalás

Tudományos Diákköri munkám során egy fotoszintetikus baktérium, a *Thiocapsa roseopersicina* kénanyagcseréjében feltehetően szerepet játszó, korábban még nem vizsgált fehérjéjének tisztítását és biokémiai jellemzését végeztem el.

Optimalizáltam azt az eljárást, amellyel nagy térfogatú, N-terminálisán StrepII affinitás peptiddel fuzionáltatott rekombináns Sqn fehérjét termelő *T. roseopersicina* kultúrák sejtjeinek feldolgozása során létrehozott membrán frakcióból az Sqn fehérjét nátrium-bromid segítségével fel lehet szabadítani. Az így oldhatóvá tett fehérjét affinitás kromatográfiával a későbbi vizsgálatokhoz szükséges magas koncentrációban és nagy tisztaságban sikerült tisztítanom. Az aerob körülmények közt tisztított nagy koncentrációjú oxidált és Na-ditionittal redukált, majd durokinonnal újra oxidált Sqn minta abszorpciós spektrumát meghatároztam, mellyel igazoltam, hogy a fehérje redox aktív flavin kofaktort tartalmaz. A flavin kofaktort metanollal denaturált fehérjéből nem sikerült felszabadítani, ami annak a fehérjéhez való kovalens kötődésére utal. Megállapítottam, hogy az Sqn szulfid függő kinon redukciót képes katalizálni. Aktivitásának hőmérséklet és pH függését, valamint kinetikai paramétereit meghatároztam. A *T. roseopersicina* sejtekből létrehozott szferoplasztok NaBr-os kezelésével létrehozott minták Sqn aktivitásának vizsgálatával igazoltam, hogy a fehérje a sejtmembrán periplazmatikus felszínéhez kötődik, hasonlóan az Sqr enzimekhez.

Az Sqn fehérje tisztítása és biokémiai vizsgálata során kapott eredményeim alapján a szulfid kinon oxidoreduktáz 2 enzimről és annak a *T. roseopersicina* sejtek anyagcseréjében betöltött szerepéről szerzett ismereteimet a 18. ábrán foglalom össze. Vizsgálataim alapján az Sqn fehérje, feltehetően az Sqr enzimhez hasonlóan, a sejtmembránhoz annak periplazmatikus oldalán kötődik, feltehetően az Sqr fehérjéhez képest kisebb erővel, ahol a sejtek számára magas koncentrációban elérhető szulfid, mint elektronforrás oxidálásával játszhat szerepet a *T. roseopersicina* kénanyagcseréjében. A Tudományos Diákköri munkám során kapott eredményekkel így sikerült kiegészítenem a fototróf bíbor kénbaktériumok kénanyagcsere folyamatairól korábban felállított modellt (18. ábra).



18. ábra: A *Thiocapsa roseopersicina* szulfid oxidáló enzimeinek (Fcc, Sqr illetve Sqn) a sejt anyagcsere folyamataiban betöltött szerepe.

7. Hivatkozások

- Arieli, B.,** Shahak, Y., Taglicht, D., Hasuka, G., and Padan, E. (1994). Purification and characterization of sulfide-quinone reductase, a novel enzyme driving anoxygenic photosynthesis in *Oscillatoria limnetica*. *J Biol Chem* **268**:5705-5711
- Berks, B. C.,** (1996). A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors? *Mol Microbiol* **22**:393-404
- Blankenship, R.E.** (1992). Origin and early evolution of photosynthesis. *Photosyn Res* **33**: 91-111
- 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.** (1989). Sulfur oxidation by phototrophic bacteria. *Biochim Biophys Acta* **975**(2):189–221.
- Cherney, M.M.,** Zhang, Y., Solomonson, M., Weiner, J.H., James, M.N., (2010). Crystal structure of sulfide:quinone oxidoreductase from *Acidithiobacillus ferrooxidans*: insights into sulfidotrophic respiration and detoxification. *J Mol Biol* **398**:292–305.
- Eggink, G.,** Engel, H., Vriend, G., Terpstra, P., Witholt, B., (1990). Rubredoxin reductase of *Pseudomonas oleovorans*. Structural relationship to other flavoprotein oxidoreductases based on one NAD and two FAD fingerprints. *J Mol Biol* **212**(1):135–142
- Gogotov, I.N.,** Zorin, N.A., Kondrat'eva, E.N.. (1976). Purification and properties of hydrogenase from phototrophic bacterium *Thiocapsa roseopersicina*. *Biokhimiia* **41**:836-842.
- 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

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

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

Karplus, P.A. and Schulz, G.E., (1987). The refined structure of glutathion reductase at 1.54 Å resolution. *J Mol Biol* 195:701-729

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

Nübel, T., Klughammer, C., Huber, R., Hauska, G. and Schütz, M., (2000). Sulfide-quinone reductase in membranes of the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus* (VF5). *Arch Microbiol* 173:233-44

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

Rich, P.R., Fisher, N., (1999). Generic features of quinone binding sites. *Biochemical Society Transactions* 27:561–565

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

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

Schütz, M., Klughammer, C., Griesbeck, C., Quentmeier, A., Friedrich, C. G., Hauska, G., (1998). Sulfide-quinone reductase activity in membranes of the chemotrophic bacterium *Paracoccus denitrificans* GB17. *Arch Microbiol* 170:353–360

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

Shahak, Y., Schütz, M., Bronstein, M., Griesbeck, C., Hauska, G., and Padan, E. ,(1999). Proceedings of the 9th International Symposium Phototrophic Prokaryotes (Vienna 1997), Peschek, G.A., Löffelhardt, W., and Schmetterer, G. (Eds.) Plenum Press, New York, 217-228.

Theissen, U., Martin, W., (2008). Sulfide quinone oxidoreductase (SQR) from the lugworm *Arenicola marina* shows cyanide- and thioredoxin-dependent activity. *FEBS J* **275(6)**:1131-9

Wakai, S., Tsujita, M., Kikumoto, M., Manchur, M.A., Kanao, T., Kamimura, K., (2007). Purification and Characterization of Sulfide:Quinone Oxidoreductase from an Acidophilic Iron-Oxidizing Bacterium, *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Biosci Biotechnol Biochem* **71(11)**:2735–2742

Wierenga, R.K., Terpstra, P. and How, W.G.I. (1986) Prediction of the occurrence of the ADP-binding beta alpha beta-fold in proteins, using an amino acid sequence fingerprint. *J Mol Biol* **187**: 101–107

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.

8. Rövidítés jegyzék

µg: mikrogramm

µl: mikroliter

BSA: szarvasmarha szérum albumin

EDTA: etiléndiamin-tetraecetsav

FAD: flavin-adenin-dinukleotid

g: nehézségi gyorsulás

HABA: hidroxí-azofenil-benzoidsav

kDa: kiloDalton

LB: Luria-Bertani

ml: milliliter

NaCl: nátrium-klorid

NAD⁺: nikotinamid-adenin-dinukleotid

NADP⁺: nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát

PAGE: poliakrilamid gélelektroforézis

rpm: fordulatszám / perc

SDS: nátrium-dodecilszulfát (Sodium Dodecil Sulfate)

TBS: Tris-Bór-EDTA

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

TGS: Tris-Glicin-SDS

Tris-HCl: Tris-hidrogén-klorid

Tris: Tris-(hidroximetil)-metilamin

9. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Rákhely Gábornak és Prof. Kovács L. Kornélnak, hogy lehetővé tették számomra a SZTE TTIK Biotechnológiai Tanszék laboratóriumában végzett munkámat. Külön köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Tóth Andrásnak munkám során nyújtott útmutatásaiért és segítségéért, illetve köszönöm Duzs Ágnesnek mindennapos fáradozását, határtalan türelmét.

10. Nyilatkozat

Alulírott Dobrotka Paula a dolgozatban leírt munkafolyamatok közül a:

- *Thiocapsa roseopersicina* sejtenyészetek készítését,
- *Thiocapsa roseopersicina* sejtek kezelését:
 - szferoplaszt előállítását *Thiocapsa roseopersicina* sejtekből,
 - *Thiocapsa roseopersicina* sejtek feltárását,
 - membrán és szolubilis sejtfrakciók előállítását,
 - fehérjeszolubilizálást a membrán frakció minták NaBr-al történő kezelésével,
- fehérje tisztítását és analízisét:
 - fehérje tisztítását affinitás kromatográfiával,
 - denaturáló poliakrilamid gélelektroforézist,
 - western hibridizációt,
- tisztított fehérjék vizsgálatát:
 - fehérje mennyiségi meghatározását Micro-Lowry módszerrel,
 - tisztított Sqn fehérje, valamint redukált és oxidált fehérjeminták abszorpciós spektrumának meghatározását,
 - sejtfrakciók és fehérjeminták szulfid függő kinon redukáló aktivitásának mérését,
 - az Sqn enzim aktivitásának a reakcióparaméterektől való függésének vizsgálatát,
 - Sqn fehérje enzimkinetikai paramétereinek meghatározását,
 - tisztított fehérje flavin csoport tartalmának vizsgálatát

végeztem el.

Dobrotka Paula

Szeged, 2012. november 5.