

XXXII. OTDK Biológia Szekció

Kiss Enikő

II. éves Biológia MSc

MTA SZBK Biofizikai Intézet
SZTE TTIK Biotechnológiai Tanszék

Flavocitokróm c fehérjék kinetikai és szerkezeti vizsgálata egy fototróf bíbor kénbaktériumban

Témavezetők:

Dr. Tóth András tudományos munkatárs

Dr. Rákhely Gábor egyetemi docens

2014



1. Bevezetés

Ismert toxicitása ellenére a szulfid az élőlények metabolikus útvonalainak egyik igen jelentős komponense: elektron donorként szolgál számos fotoszintetikus litotróf organizmus számára, az emlősöknél, mint neurotranszmitter fordul elő, metabolizmusának rendellenességei pedig szerepet játszhatnak különféle kórképek kialakulásában is, mint például az Alzheimer-kór illetve a Down-szindróma. A szulfid metabolizmus szabályozásának kialakulása az evolúció korai szakaszára vezethető vissza, mikor is a szulfid tartamú, toxikus, oxigén-mentes óceáni környezetben élő első mikroorganizmusok túlélését szulfid detoxifikáló fehérjék biztosították. Ezek az ősi, flavoproteinek családjába tartozó szulfid kinon oxidoreduktáz enzimek konzerváltan máig fennmaradtak az élővilág különböző fejlettségi szintjein, melyek segítségével az élőlények képesek kezelni és irányítani a szulfidmetabolizmussal kapcsolatos folyamatokat.

A szulfid kinon oxidoreduktáz enzimek fontos szerephez jutnak a fotoszintetikus szervezetek szulfid-függő energiakonzerváló folyamataiban, melyek során szulfidot oxidálnak, majd a felszabaduló elektronokat a fotoszintetikus elektron transzport láncba juttatják. A magasabb rendű élőlények esetében a szulfid neurotranszmitter homeosztázisának fenntartását illetve a megnövekedett szulfid szint szulfidoxidáció általi szabályozását biztosítják, továbbá szerepet játszhatnak különböző nehézfém detoxifikáló folyamatokban is, például az arzéntoleranciában.

A szulfid kinon oxidoreduktáz enzimek flavin csoportjuknak köszönhetően megfelelő modellnek bizonyulnak a flavin-kofaktor és a fehérje közötti kölcsönhatás vizsgálatához, melyhez jól tisztítható és könnyen módosítható fehérjemodellre van szükség. A szulfid kinon oxidoreduktázokkal nagyfokú homológiát mutató, fototróf bíbor kénbaktériumokban megtalálható, szintén szulfidmetabolizmusban szerepet játszó flavocitokróm c szulfid dehidrogenáz enzim számos kedvező tulajdonsága miatt a FAD – fehérjeváz közötti kapcsolat megfelelő modelljének bizonyulhat.

1.1 Fototróf bíbor kénbaktériumok

A fotoszintetikus bíbor kénbaktériumok energiatermelésük során redukált szervetlen kénvegyületeket (tioszulfátot, szulfidot, elemi ként) használnak fel energia- és elektronforrásként, II-es típusú fotoszintetikus reakció centrummal rendelkeznek, a CO₂ kötés pedig a Calvin cikluson keresztül valósul meg bennük. Filogenetikailag a *Gammaproteobacteriumok* csoportjához rendelhetők, mely csoporton belül két családot

különböztethetünk meg a csoportra jellemző kénraktár, a kénglobulus elhelyezkedése alapján. A *Chromatiaceae* családnál a kénglobulus képződés sejtfalon belüli folyamat, míg az *Ectothiorhodospiraceae* családnál a globulusok sejtfalon kívül raktározódnak. (Imhoff, 2008).

A *Chromatiaceae* család eltérő fiziológiai tulajdonságok alapján további két csoportra osztható. A speciális életkörülményeket igénylő fajok szigorúan anaerobok és obligát fototrófok. Fő elektronforrásuk a szulfid, míg a hidrogén és a tioszulfát mint elektrondonor nem használatos. A második csoportba tartozó fajok, amelyek legszélesebben vizsgált modellorganizmusa az *Allochromatium vinosum* változatos metabolizmusuknak köszönhetően különféle körülményekhez képesek alkalmazkodni. A szulfid mellett képesek elemi kén és tioszulfát hasznosítására is (Imhoff, 2005a), redukált kénvegyületek jelenlétében fotolitotróf, azok hiányában pedig fotoorganoheterotróf életmódot folytatnak (Gorlenko, 1974; Kämpf és Pfennig, 1980; Kondrat'eva és mts., 1981).

1.2 Fototróf bíbor kénbaktériumok kénanyagcseréje, kénanyagcserében szerepet játszó enzimek

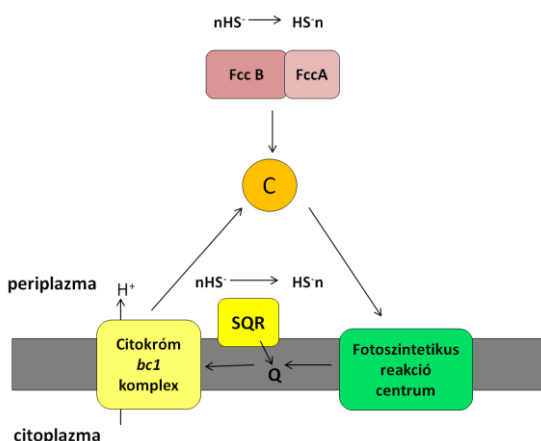
A fototróf bíbor kénbaktériumok esetében a kénanyagcsere és az energiametabolizmus egymással szorosan kapcsolt folyamatok. Aerob, fotoszintetikus szervezetekben a szerves anyag szintézishez szükséges koenzimek redukálását a fotoszintetikus elektrontranszport láncból származó elektronok biztosítják, a redukcióban szerepet játszó elektronokat pedig a vízbontásból származó elektronok pótolják. A bíbor kénbaktériumokra jellemző anaerob fotoszintézisnél viszont vízbontás nincs, a ciklikus elektrontranszport láncból kilépő elektronok pótlását a redukált szervesetlen kénvegyületek (SH^- , S , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, SO_3^{2-}) oxidációja során felszabaduló elektronok biztosítják. A redukált kénvegyületek oxidálásáért különböző, citoplazmatikus, membrán kötött vagy periplazmatikus enzimek, enzim-komplexelek felelősek.

A szulfid elemi kénre való átalakulását két enzim, a flavocitokróm c (Frigaard és mts., 2009) illetve a szulfid kinon oxidoreduktáz enzim (Schütz és mts., 1997) által katalizált folyamat biztosítja (1.ábra). A periplazmatikus, két alegységből álló flavocitokróm c enzim (Fcc) a szulfid oxidációja során felszabaduló elektronokkal szolubilis c-típusú citokróm fehérjét redukál. A citokróm c fehérjére került elektronok a fotoszintetikus reakció központ által kötött kinon molekulára továbbítódnak, melyről az elektronok citokróm *bc1* komplexen keresztül visszajutnak a szolubilis citokróm molekulára. A ciklikus folyamat során protongradiens alakul ki a citoplazma és a periplazmatikus tér között, az ebben felhalmozott kemiozmotikus energia az ATP-szintézisére fordítódik. A redukált kinon molekula a NADH-

dehidrogenáz által katalizált $\text{NAD}^+ \rightarrow \text{NADH}$ átalakuláshoz is szolgáltat elektronokat. Annak ellenére, hogy az Fcc által katalizált folyamat számos szulfidhasznosító organizmusnál megjelenik, a flavocitokróm c enzim nem esszenciális a szulfid oxidáció folyamatában (Brune, 1995b, Reinartz és mts., 1998). A szulfid kinon oxidoreduktáz (Sqr) enzim útján megvalósuló szulfid oxidáció hasonló az Fcc által katalizált reakcióhoz. Az Sqr a flavocitokróm c enzimmel ellentétben membránkött enzim, a szulfid oxidáció során felszabadított elektronokat pedig nem szolubilis citokróm c fehérjére, hanem közvetlenül a membrán kinon raktárában lévő kinon molekulákra továbbítja, ami egy energetikailag kedvezőbb folyamat. Az Fcc-vel ellentétben az Sqr nélkülözhetetlen a szulfidhasznosítás folyamatában.

A disszimilációs szulfít reduktáz enzim (DsrAB) az elemi kén szulfittá alakításában vesz részt. A szulfid oxidáció szempontjából nem esszenciális enzim, viszont az intracellulárisan felhalmozott kén oxidációjához elengedhetetlen (Pott és Dahl, 1998).

A szulfít szulfáttá való átalakítását a szulfít dehidrogenáz enzim végzi, míg a szintén elektron donorként használatos tioszulfát oxidációjáért a Sox multienzim komplex felel.



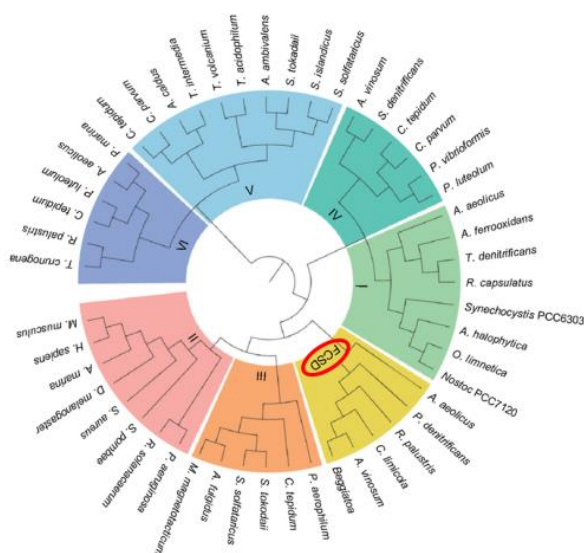
1.ábra: Bíbor kénbaktériumok szulfid oxidáló enzimei működésének sematikus ábrája.
(FccB: Fcc nagy alegysége, FccA: Fcc kis alegysége; Sqr: szulfid kinon oxidoreduktáz;
Q: kinon raktár, C: c-típusú citokróm fehérje.)

1.3 Szulfid kinon oxidoreduktáz típusú fehérjék

A flavoprotein diszulfid reduktázok (FDR) I. csoportjába tartozó flavocitokróm c enzim FAD kofaktor tartalmú nagy alegysége (FccB) egy szulfid kinon oxidoreduktáz típusú fehérje. A strukturális hasonlóságoknak köszönhetően a flavocitokróm c enzimnek (FCSD) egy *Allochrodatum vinosum*-ból nyert formája és annak meghatározott térszerkezete - Sqr protein struktúra hiányában - hosszú ideig a szulfid kinon oxidoreduktáz enzimek egyetlen összehasonlítási alapja volt.

Különböző eredetű Sqr enzimek mutagenézise, szekvencia-vizsgálata és az általuk katalizált enzimátikus folyamat vizsgálata során sikerült azonosítani három FAD-kötő domént és 6 további régiót. Ezeknek az Sqr „ujjlenyomatok” segítségével az Sqr fehérje családot hat csoportra osztották fel (2. ábra), melyek szubsztrát affinitásukban, FAD- és kinon-kötésükben illetve az aktív centrumukban különböznek egymástól.

A strukturális különbségeket kulcs aminosavakban bekövetkező változások eredményezik, melyek összefüggnek a fehérjék evolúciós rokonságával is. A fehérjecsoportok FAD kofaktor kötése általában Cys vagy Tyr aminosavon keresztül valósul meg, a szulfidkötésért jellemzően két Cys között kialakuló diszulfid híd felel, míg a Ser, Asp, Val, Thr, Ile és Pro aminosavak a szulfid aktív centrumhoz való irányításában vesznek részt. A kinon kötésben szerepet játszó aminosavak – melyek általában Ile és Phe – az FccB esetében nem jelentősek, mivel a flavocitokróm c nagy alegysége az elektronokat kinon molekulák helyett az elektronakceptorként működő kis alegységre (FccA) juttatja.



2. ábra: Szulfid kinon oxidoreduktáz típusú enzimek csoportosítása. (Marcia és mts., 2009)

1.4 Flavocitokróm c enzim

A flavocitokróm c egy szolubilis, periplazmatikus enzim, mely egy szulfid-kötő, flavin csoportot tartalmazó nagyobb alegységből (FccB) és egy citokróm típusú, két, I-es típusú hem csoportot kötő kis alegységből (FccA) áll (Brune, 1995b). A két alegység (3. ábra) egymással szoros fizikai és funkcionális kapcsolatban van, melyet 13 H-kötés és egy sóhíd stabilizál. A fehérje komplex tömege 67kD, a három doménből álló flavoprotein alegység 46kD, míg a két doménből álló citokróm alegység 21kD. Az Fcc szolubilis, periplazmatikus fehérje, amit igazol, hogy mindkét alegység szekvenciája tartalmaz egy N-terminális Tat szignál

szekvenciát, mely a funkcionális Fcc periplazmába való kijutását biztosítja a Tat transzport rendszeren keresztül (Dolata és mts., 1993).

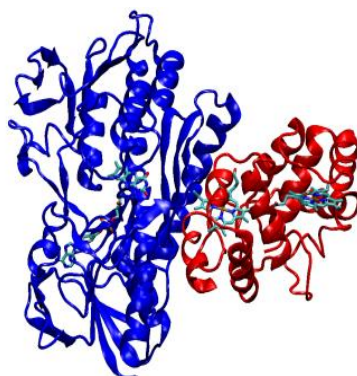
A citokróm alegységet felépítő két domén az alacsony szekvencia-hasonlóság ellenére hasonló méretű és struktúrájú, doménenként négy α -hélix struktúrát és több közbülső, hem csoportot burkoló polipeptid hurkot tartalmaz. A 77 és 85 aminosavból álló doméneket 12 aminosavnyi szekvencia, a két hem csoportot pedig két propionsav csoport között kialakuló H-híd kötés kapcsolja össze.

Az enzim flavoprotein alegysége a diszulfid oxidoreduktáz fehérjecsaládba tartozó glutation reduktázokkal mutat strukturális hasonlóságot, az első, FAD kötésben szerepet játszó domén mindkét fehérje esetében megtalálható. A glutation reduktázoknál NADP kötéséért felelős második domén funkciója a flavocitokróm c esetében ismeretlen. A nagy alegység első két doménje között homológia fedezhető fel, mely ősi génduplikációt feltételez. A fehérjeszerkezet szempontjából az első és a második domén egy 5 polipeptidből álló, paralell β -redőt tartalmaz, melyet egyik oldalról három α -hélix, másik oldalról pedig egy 3 polipeptidből álló antiparalel, β -redő határol. Ez a $\beta\alpha\beta$ -redő struktúra a glutation reduktáz családba tartozó flavoproteinekre jellemző, konzervált glicineket tartalmazó FAD kötő motívum (Wierenga és mts., 1986). A FAD kofaktor Fcc nagy alegységéhez való kovalens kötődése a Cys42 aminosavon keresztül valósul meg. (Kenney és Singer, 1977; Van Beeumen és mts., 1990, 1991). FAD kötésben szerepet játszanak még a Cys100, Cys161, Cys274, Cys296 és Cys337 csoportok is. Mind a 6 cisztein az apoprotein karboximetil származékának tekinthető. Az FccB harmadik doménje a citokróm alegység kötéséért felelős, 3 polipeptid láncból álló antiparalel β -redőből és egy azt követő α -hélixből áll.

Az Fcc-n belüli flavin magas redoxpotenciállal rendelkezik, ennek következtében a FAD N5 pozíciója képes a szulfid megkötésére. A szulfid-kötő FccB alegység redox-aktív helyének tekinthető a flavin gyűrű fölött elhelyezkedő, Cys161 és Cys337 között létrejövő diszulfid híd, továbbá a flavin gyűrű fölötti α -helixet felépítő Gly305 és Tyr306 flavin gyűrűvel kialakított H-kötései is megfigyelhetők.

A szulfid oxidációja során felszabaduló elektronok először a nagy alegység FAD kofaktorára kerülnek, majd a redukált FAD molekuláról tovább transzportálódnak a kis alegység hem csoportjára, ami később egy szolubilis citokróm c fehérjének adja tovább az elektronokat. Az intramolekuláris elektron transzfert a két alegység közötti szoros fizikai kapcsolat illetve az elektron transzfert biztosító aminosavak jelenléte teszi lehetővé. A flavoprotein alegység tartalmaz 3 aminosavat (Trp391, Tyr306, Thr336), melyek elég közel helyezkednek el a hem csoporthoz ahhoz, hogy biztosítsák a FAD kofaktorról hemre történő

esetleges elektronáramlást, mivel a FAD és a hem csoportok túlságosan távol helyezkednek el egymástól ahhoz, hogy megtörténjen a közvetlen elektron átadás. A Trp391 indol gyűrűje közvetlenül a flavin és a hem csoportok között fekszik, mely elektron transzfer funkciót feltételez, a Tyr306 pedig H-kötésen keresztül közvetlenül kapcsolódik a flavin gyűrűhöz, ami szintén kedvező útja lehet a hemre történő elektronáramlásnak. Mivel a Thr336 kovalensen kapcsolt a diszulfid-hidat kialakító ciszteinekhez (Cys161-Cys337), így nem kizárt, hogy azok a szulfidkötés mellett a FAD-ról hemre történő elektronáramlás folyamatában is szerephez jutnak.



3. ábra: *Allochromatium vinosum* flavocitokróm c nagy alegység (kék) és kis alegység (piros) térszerkezete (Chen és mts., 1994).

1.5 *Thiocapsa roseopersicina* BBS

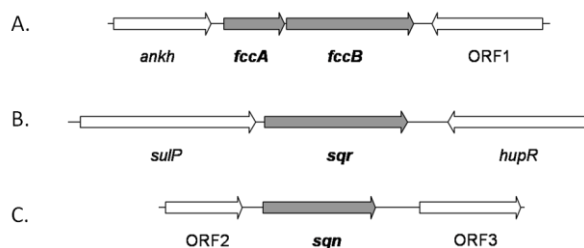
A *Thiocapsa roseopersicina* a bíbor kénbaktériumok *Chromatiaceae* családjába tartozó, fotoszintetizáló, Gram negatív baktérium (Gogotov, 1976, Pfenning és Trüpper 1991), lelőhelyeként az északi fekvésű Fríz-szigeteket tartják számon (Bogorov és mts., 1974). Laboratóriumi növesztése során a hőmérsékleti optima 25-29°C, folyadékkultúrában 4-5 nap alatt nő fel, míg táplemezen tartva 14 nap alatt formál telepeket. Anaerob organizmus, ami kizárólag oxigén-mentes környezetben képes fotoszintetizálni, oxigén jelenlétében pedig heterotróf anyagcserét folytat. Elektron donorként többek közt redukált szervetlen kénvegyületeket használ, illetve vízbontó komplex nélküli, II-es típusú fotoszintetikus rendszerének következtében a baktériumképtelen az oxigén termelésére.

Összetett kénanyagcseréje során tioszulfátot, szulfidot, szulfitot és ként hasznosít. A tioszulfát szulfáttá és elemi kénné alakításáról a baktérium Sox enzim-rendszere gondoskodik. A keletkezett kén molekulákból kénglobulusok formálódnak, melyek a periplazmatikus térben halmozódnak fel. Ezek a felhalmozódott globulusok eredményezik a *T. roseopersicina* kultúrák színének opálos árnyalatát. A keletkezett kén további oxidációját disszimilációs szulfid

reduktázok katalizálják, a létrejövő szulfidot pedig a flavocitokróm c illetve szulfid kinon oxidoreduktáz enzim oxidálja.

1.6 Szulfid oxidációban szerepet játszó gének *Thiocapsa roseopersicina* genomszekvenciában

Kutatócsoportunk fő kutatási területe a bíbor kénbaktériumok kénanyagcseréjében szerepet játszó enzimek biokémiai és funkcionális vizsgálata. Modellorganizmusunk a laboratóriumi körülmények között már sokat vizsgált *Thiocapsa roseopersicina* bíbor kénbaktérium, melynek genomszekvenciája 95%-ban ismert. Korábban elvégzett *in silico* vizsgálatok során három, feltételezhetően szulfid-oxidáló fehérjét kódoló régiót sikerült azonosítani a flavocitokróm c (*fccAB*), a szulfid kinon oxidoreduktáz 1 (*sqr*), és a szulfid kinon oxidoreduktáz 2 (*sqn*) géneket (4. ábra).



4. ábra: Szulfid oxidációban szerepet játszó gének és genomi környezetük *T. roseopersicina*-ban.

1.7 Flavocitokróm c enzimet kódoló operon *Thiocapsa roseopersicina*-ban

A korábbi munkák során felfedezett, flavocitokróm c enzimet kódoló régió két azonos irányú és egymást követő, valószínűleg egy operonba rendeződő nyitott leolvasási keretből áll (4.ábra/A.). A génekről képződő fehérje termékek 64%-os illetve 74%-os hasonlóságot mutatnak az *Allochromatium vinosum* bíbor kénbaktérium flavocitokróm c fehérjéjének kis (FccA) és nagy (FccB) alegységével, így a *T. roseopersicina* flavocitokróm c enzimet kódoló géneket *fccA*-nak illetve *fccB*-nek nevezték el.

Az *fcc* operonon kívül elhelyezkedő *ankh* és ORF1 leolvasási keretek egy kénanyagcseréhez funkcionálisan nem kapcsolódó, ankirin homológ fehérjét illetve egy ismeretlen fehérjét kódolnak. Az *fccB* génről íródó fehérje N-terminális végén egy potenciális Tat szignál peptid (RRDFV) található, mely a Tat transzport rendszeren keresztül a periplazmatikus térbe transzportálódó fehérjékre jellemző szignál.

Az operonról termelődő fehérjék aminosav szekvenciájának vizsgálata során kiderült, hogy a fehérje nagy alegysége (FccB) FAD kötésben szerepet játszó motívumokat tartalmaz, a

kis alegység (FccA) aminosav szekvenciájában pedig olyan konzervált aminosavakat (cisztein, hisztidin) azonosítottak, melyek a citokróm c fehérjékben jellemzően a hem kofaktorok kötéseért felelősek. A konzervált aminosavak fehérjében való elhelyezkedése alapján feltételezni lehet, hogy a kis alegység (FccA) két hem csoportot köt meg.

1.8 *T. roseopersicina* flavocitokróm c fehérje termelését biztosító expressziós vektor

A *T. roseopersicina* genomjában azonosított *fcc* operon géntermékének (flavocitokróm c fehérje) biokémiai és kinetikai vizsgálatához nagy mennyiségű tisztított fehérjére van szükség, melynek előállítása egy megfelelő expressziós rendszer kidolgozásával valósítható meg.

Csoportunk munkatársai korábban a flavocitokróm c fehérje túltermeltetéséhez *T. roseopersicina* gazdasejtben működő expressziós vektort (pDSFC) állítottak elő. Ebben az FccAB fehérje kifejeződését az expressziós vektorba épített, *T. roseopersicina* genomból származó, karotinoid bioszintézisben szerepet játszó CrtC és CrtD fehérjéket kódoló operon előtt elhelyezkedő *crt* promóter biztosította (Kovács AT. és mts.,).

Az elkészült, fehérjét kódoló vektort *T. roseopersicina* sejtekbe juttatva rekombináns FccB és vele együtt kifejeződő vad típusú FccA fehérjét termelő expressziós törzset (FOXF) hoztak létre.

A fehérje tisztíthatóságát a rekombináns flavocitokróm c C-terminálisán elhelyezkedő Strep-II és FLAG affinitás peptid biztosította.

2. Célkitűzések

Diákköri kutatásom célja egy ősi flavoprotein, a diszulfid oxidoreduktázok családjába tartozó *T. roseopersicina* flavocitokróm c fehérje variánsok FAD kofaktorának fluoreszcencia kinetikai vizsgálata, egy újszerű, nagy felbontású, ultragyors fluoreszcenciai kinetikai mérési módszer segítségével, ami hozzájárulhat a fehérje és a kofaktor közti kapcsolat részletesebb megismeréséhez.

Előzetes ismeretek szerint a FAD fénnel gerjeszthető, fluoreszcencia kinetikájának lecsengése pedig függ a FAD kofaktor és a fehérjekörnyezet közötti kapcsolat minőségétől. Szorosabb kapcsolat esetén a gerjesztett FAD molekuláról fehérjére történő energia átadás gyorsabb, a lecsengési idő mérése pedig információt adhat a fehérje és FAD molekula közötti kapcsolat erősségéről.

Az ultragyors fluoreszcencia kinetikai vizsgálatokhoz biokémiaailag és kinetikailag jól jellemzett, módosítható, nagy mennyiségben és töménységben előállítható fehérjére van szükség.

A vizsgálatokhoz szükséges nagy mennyiségű és nagy töménységű fehérje előállítását a *T. roseopersicina* fehérjetermelő rendszer optimalizálásával kívántam elérni. Célom volt továbbá egy csak FAD tartalmú alegységet tartalmazó flavocitokróm c fehérje változatot termelő törzs létrehozása is, mellyel a FAD kofaktor vizsgálata mellett a kis- és nagyalegység közti kapcsolat is megfigyelhető.

A fehérjetermelő rendszer optimalizálása mellett szükség volt a fluoreszcencia kinetikai vizsgálatokhoz kapcsolódó enzimkinetikai analízis optimalizálására is, melyet a fehérjevariánsok biokémiai és kinetikai vizsgálatával kívántam elérni.

3. Anyagok és módszerek

3.1 Baktérium törzsek

Név	Genotípus	Referencia
<i>E.coli</i> törzsek:		
S17-1 lambda pir	294 (<i>recA pro res mod</i>) Tp^r Sm^r (pRP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7)	Herrero és mts., 1990
XL-1 Blue MRF'	<i>recA1 gyrA96 (F' lacI^q Z)</i> Tc^r	Stratagene
<i>T. roseopersicina</i> törzsek:		
FOX	$\Delta hynSL$, $\Delta hupSL$ Δfcc	Rákhely és mts., személyes közlés
FOX ^F	<i>FOX+ pDSFC</i>	Duzs Ágnes, személyes közlés
FOQRON	Δhyn , Δhup , Δfcc , Δsqr , Δsqn	Rákhely és mts., személyes közlés
FOB	FOX+pDSFCB	ez a munka

1. táblázat: Munkám során felhasznált baktérium törzsek és tulajdonságaik.

3.2 Primerek

Név	Szekvencia
FCCBO16F	5'-GCGCATATGAAGATCAACAGACGTGATTTTCG-3'
FCCBO16R	5'-CGGAGCTCCCGAATGAGTCTTTCACGATG-3'
OMHEC2R	5'-TAATCGGCCGCTGCCACTCATCGCAGTC-3'

2. táblázat: Munkám során felhasznált primerek és szekvenciájuk.

3.3 Mikroorganizmusok tenyésztése

3.3.1 Növesztési körülmények *E. coli* törzsekhez

Az *E. coli* törzseket LB folyadéktáptalajban, Erlenmeyer lombikban, a kísérletnek megfelelő hőmérsékleten, rázatott tenyészetben vagy LB agar lemezen, termosztátban növesztettem (Ausubel és mtsai., 1996).

A folyadéktáptalajoknál alkalmazott antibiotikum (ampicillin, kanamicin) koncentráció 100 µg/ml volt.

LB (Luria-Bertani) folyadéktáptalaj (1 liter) összetétele: 10 g NaCl, 10 g tripton, 5 g élesztő kivonat, az LB táplemez a fentiekén kívül további 1,5 % agart tartalmaz.

SOC tápoldat (SOB + Mg^{2+}) (1 liter) összetétele: 0,5 g NaCl, 20 g tripton, 5 g élesztő kivonat, 10 mM $MgSO_4$

3.3.2 Növesztési körülmények *Thiocapsa roseopersicina* törzsekhez

A *T. roseopersicina* törzseket Pfenning féle tápoldatban, csiszolt dugós Erlenmeyer lombikban vagy táplemezen, 25-28°C-os hőmérsékleten, mikroaerofil környezetben, folyamatos megvilágítás mellett 4-5 napig növesztettem.

PC tápoldat(1 liter): 20 g NaCl, 1 g KH_2PO_4 , 1 g $MgCl_2$, 1 g KCl, 1 g NH_4Cl , 2 g $NaHCO_3$, 2 g $Na_2S_2O_3$, 20 μ l B12 vitamin (1000 μ g /ml), 1 ml Fe-EDTA, 1 ml mikroelem oldat.

Mikroelem oldat: 2975 mg Na_2 - EDTA, 300 mg H_3BO_4 , 200 mg $CaCl_2 \cdot 6 H_2O$, 100 mg $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$, 30 mg $MnCl_2 \cdot 4 H_2O$, 30 mg $Na_2MoO_4 \cdot 2 H_2O$, 20 mg $NiCl_2 \cdot 6 H_2O$, 10 mg $CuCl_2 \cdot 2 H_2O$, 1000 ml vízben (Pfennig és Trupper, 1992).

A tápoldatoknál alkalmazott antibiotikum (gentamicin, streptomycin, kanamicin) koncentráció 25 μ g/ml volt.

3.4 DNS módosítással kapcsolatos munkák

3.4.1 Plazmid DNS izolálás *Escherichia coli*-ból

A plazmid DNS izolálás 30 ml, antibiotikum tartalmú LB tápoldatban, 37°C-on, éjszakán át növesztett baktérium kultúrából történt. Az izoláláshoz a Gen-Elute Plazmid Miniprep Kit-et (Sigma) használtam. A tápoldatban felnőtt sejteket 4,5 ml-enként külön mikrocentrifugacsövekben, centrifugálással (1 perc, 7000 rpm) gyűjtöttem össze, a centrifugálás után megmaradt sejteket pedig 200 μ l, hűtött (4°C), RNáz tartalmú szuszpendáló oldatban vettem fel. A sejtekre 200 μ l lízis puffert mértem, majd kézzel megforgattam a mikrocentrifugacsöveket. A feltárt sejtekhez ezután 350 μ l neutralizáló oldatot adtam, szintén megforgattam a csöveket, majd centrifugálás (10 perc, 13000 rpm) után pipettával leszívtam a plazmidot tartalmazó felülúszót. A plazmid tisztító oszlopot 500 μ l oszlop előkészítő oldattal kezeltem, majd az oldatot centrifugálással távolítottam el róla (1 perc, 13000 rpm). Az előkészített oszlopra 750 μ l felülúszót pipettáztam, majd centrifugálással átszűrtem az oszlopon (1 perc, 13000 rpm). Két lépésben, 2x750 μ l mosó pufferrel, centrifugálással (1

perc, 13000 rpm) távolítottam el a nem specifikusan kötődő anyagokat. A mosó puffer eltávolítása érdekében az oszlopot üresen is centrifugáltam. Az oszlopra kötődő plazmid DNS-t 2x20 µl ultratiszta, ioncserélt vízzel, centrifugálással (1 perc, 13000 rpm) eluáltam.

3.4.2 DNS szerkezet módosítások

3.4.2.1 Emésztés restrikciós endonukleázokkal

A kísérletek során a Fermentas cég által gyártott restrikciós enzimeket használtam, és a gyártó által meghatározott körülmények között alkalmaztam őket.

3.4.2.2 Polinukleotid kináz kezelés

A DNS molekulák 5' végi foszforilálását a Fermentas cég által gyártott T4 polinukleotid kináz enzimmal végeztem el. A reakcióhoz 1 x-es polinukleotid kináz puffert, 10 mM ATP-t használtam, az inkubáció 37°C-on 20 percig, az inaktiváció pedig 75°C-on 10 percig tartott.

3.4.2.3 Alkalikus foszfatáz kezelés

A DNS fragmentumok 5' végén lévő foszfát csoportok eltávolítására szintén Fermentas cég által gyártott enzimet, FastAP alkalikus foszfatázt használtam. Az inkubáció 37°C-on, 30 percig, az inaktiválás 65°C-on 15 percig tartott.

3.4.2.4 Ligálás

A DNS fragmentumok ligálása T4 ligázzal (Fermentas) történt. A kívánt DNS szakaszt kétszeres feleslegben adtam a meghasított vektorhoz. A reakcióhoz 5x-ös Rapid Ligáz Puffert (Fermentas) használtam. 10 percig 22°C-on történt az inkubáció.

3.4.3 Agaróz gélelektroforézis

A PCR reakciókat és a restrikciós enzimekkel történő emésztéseket gélelektroforézis segítségével ellenőriztem. A DNS fragmentumok elválasztása 1%-os agaróz gélen történt. Pufferként 1 x TAE-t (0,004 M Tris-acetát, 0,001 M EDTA) használtam és 90 V futtatási feszültséggel választottam el a különböző méretű DNS szakaszokat (Ausubel és mts., 1996).

3.4.4 DNS fragment izolálás agaróz gélből

A gélből történő fragmentizolálást a QIAquick Gel Extraction Kittel (QIAGEN) hajtottam végre. Agaróz gélelektroforézis után a géldarabot pengével vágtam ki, majd súlya háromszorosának megfelelő térfogatú QG puffert adtam hozzá (1 adag gél: 100mg=100µl). Az elegyet 50°C-on inkubáltam, 2-3 percenként kevertettem, a gél teljes feloldódása után

pedig egy gélnyi mennyiségű izopropanolt kevertem hozzá. Az oszlop előkészítése után a feloldódott géldarabot tartalmazó oldatot az oszlopra pipettáztam, majd centrifugáltam (1 perc, 13000 rpm). Az átfolyótól megszabadultam, 750 µl PE pufferrel mostam az oszlopot, majd centrifugáltam (1 perc, 13000 rpm). Miután a mosást kétszer megismételtem, az oszlopot üresen is centrifugáltam (1 perc, 13000rpm). A DNS-t 2x15 µl steril, ioncserélt vízzel, centrifugálással (1 perc, 13000 rpm) eluáltam.

3.4.5 Polimeráz láncreakció (PCR)

A PCR reakcióelegyet 31 µl végtérfigatban állítottam elő, templátként tisztított genomi DNS-t, tisztított plazmidot vagy baktérium kolóniából készített szuszpenziót, polimerázként pedig Phusion illetve DyNAZyme enzimet használtam.

3.5 Baktériumok transzformálása

3.5.1 Kémiaailag kompetenssé tett *E. coli* sejtek készítése

Az XL1-Blue MRF' és S17-1 lambda-pir sejteket 30 ml, antibiotikumot tartalmazó LB tápoldatban 37°C-on, éjszakán át növesztettem. A felnőtt kultúrákból másnap 60ml SOB+Mg tápoldatba oltottam (Sambrook és mts., 1989), majd 18°C-on, a megfelelő OD eléréséig (OD₆₀₀ = 0,4) növesztettem őket. A sejteket 10 percig jégen hűtöttem, majd centrifugáltam (7000 rpm, 10 perc, 4°C). A felülúszó eltávolítása után 16 ml TB (10 mM Pipes, 55 mM MnCl₂, 15 mM CaCl, 250 mM KCl, pH = 6,7) pufferben mostam a sejteket, 10 percig jégen állni hagytam a szuszpenziót, majd ismét centrifugáltam (7000 rpm, 10 perc, 4°C). A felülúszó eltávolítása után a sejteket 4 ml TB-ben oldottam fel, majd 300 µl DMSO-t adtam a szuszpenzióhoz. 10 perc jégen történő inkubáció után a kompetens sejteket 100 µl-enként 4°C-ra lehűtött mikrocentrifugacsövekbe osztottam szét, majd folyékony N₂-ben lefagyasztottam őket. A kompetens sejtek tárolása -80°C-on történt (Inoue és mts., 1990).

3.5.2 *Escherichia coli* transzformálása

A transzformálás során a transzformálandó DNS-t 100 µl kompetens sejthez adtam hozzá. 20-30 percig jégen inkubáltam a sejteket, amit egy 50 mp-ig tartó 45°C-os hősoikk, majd egy pár percig tartó hűtés követett. 900 µl SOB+Mg²⁺ oldat és 20 µl 20%-os glükóz

hozzáadása után a sejteket 1 órán keresztül, 37°C-on rázattam. A transzformált sejteket a megfelelő antibiotikummal kiegészített táplemezre szélesztettem ki.

3.5.3 *Thiocapsa roseopersicina* transzformálása

A *T. roseopersicina* transzformációját konjugáción keresztül valósítottam meg. A donor (*T. roseopersicina*) és a recipiens (S17 lambda-pir *E. coli*) sejteket 28 illetve 37°C-on megfelelő OD eléréséig (*T. r.*: OD₆₅₀=1,8, *E. c.*: OD₆₀₀=0,6) előtenyésztettem. A felnőtt kultúrákat lecentrifugáltam, a leülepedett sejteket pedig kétszer, 4-4 ml 4 g/l-es PC oldatban felszuszpendáltam. Centrifugálás után a PC puffer által átmosott sejteket újabb 100-100 µl PC oldatban szuszpendáltam fel. Az így kapott *T. roseopersicina* és *E. coli* sejteket egy szuszpenzióban elegyítettem, majd a sejtkeveréket konjugációs lemezre (18 g/l NaCl, 1 g/l KH₂PO₄, 1 g/l MgCl₂, 1 g/l KCl, 1 g/l NH₄Cl, 2 g/l NaHCO₃, 2 g/l Na-acetát, 2 g/l Na₂S₂O₃, 2 g NB (Nutrient Broth, Difco), 1,5 % agar, 20 µl B12 (1000 µg/ml), 1 ml Trace elements, 1 ml Fe-EDTA) cseppentettem ki. A csepp beszáradása után a lemezt éjszakán át fényen és levegőn, 28°C-on inkubáltam. Másnap a sejteket fogpiszkálóval felkapartam, a kaparékot 500 µl PC-ben felszuszpendáltam, majd ebből 10x-es hígítási sort készítettem. A hígítási sor lépéseiből 100-100 µl mennyiséget antibiotikumos szelekciós lemezre (PC, 2 g/l acetát, 25 µg/ml kanamicin) szélesztettem. A lemezeket anaerob dobozban inkubáltam, melyet Oxiod anaerogen (kat.szám: AN0025A) anaerobizáló rendszerrel oxigénmentesítettem. Az inkubáció 28°C-on, fényen történt és 14 napig tartott.

3.6 Fehérje termeltetés és tisztítás

3.6.1 Periplazma sejtfrakció előállítása fehérjetermelő *T. roseopersicina* sejtekből

Mivel a vizsgálandó fehérje periplazmatikus elhelyezkedésű enzim, így sejtől való felszabadítása, a külső membrán eltávolításával, periplazma sejtfrakció előállításán keresztül valósult meg. A fehérjetermelő *T. roseopersicina* sejteket a már korábban leírt tenyésztési paraméterek mellett szaporítottam fel. A felnőtt kultúra sejtjeit centrifugálással gyűjtöttem össze (10 perc, 7000rpm, 4°C), majd periplazma oldatban (TBS: 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl pH = 8,0, + 25% szukróz, lizozim (50 mg/ml)) szuszpendáltam fel. A szuszpenziót 30 percig 30°C-on inkubáltam, majd periplazma oldattal megegyező mennyiségű steril, hűtött vizet adtam hozzá. A vízzel elegyített sejtszuszenziót 10 percig jégen inkubáltam, majd

centrifugálás (10 perc, 7000rpm, 4°C) után a felülúszóként megjelenő, fehérjét tartalmazó periplazmát összegyűjtöttem. A periplazma frakció tárolása -20°C-on történt.

3.6.2 Fehérje tisztítás affinitás kromatográfiával

A sejtfeltárás során keletkezett, fehérjét tartalmazó periplazma sejtfrakciót affinitás oszlop kromatográfia segítségével tisztítottam. Az oszloptöltetet (Strep-tactin Superflow 50% szuszpenzió, IBA) gravitációs átfolyó oszlopba töltöttem, majd mosó pufferrel (TBS, pH = 8,0) kétszer átmostam. A periplazma frakciót az oszloptöltettel együtt 90 percig szobahőmérsékleten, folyamatos forgatás mellett inkubáltam. Az átfolyó összegyűjtése után az oszlopot 8 mosó frakción keresztül, kétszeres oszloptérfogatnyi mosó pufferrel (TBS, pH = 8,0) átmostam. Az oszlophoz kötődött fehérjét négyszer fél oszloptöltetnyi elúciós pufferrel (100 mM Tris-HCl pH = 8,0, 150 mM NaCl, 2,5 mM destiobiotin) eluáltam. A fehérjetisztítás után az oszlopot regeneráló oldattal (100 mM Tris-HCl pH = 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM HABA (hidroxizafenil-benzoidsav) kezeltem. Az újra felhasználható oszlopot 4°C-on tároltam.

3.6.3 Denaturáló poliakrilamid gélelektroforézis

A fehérjék meghatározását illetve molekulatömeg szerinti elválasztását nátrium-dodecilszulfát poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE) módszerrel végeztem (Sambrook és mts., 1989). Az 1,5 mm vastagságú, 10%-os poliakrilamid géleket Tris-glicin puffer rendszerben futtattam meg. Az alsó, szeparáló gél és a felső, gyűjtő gél külön állítottam elő az alábbi előírás szerint:

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.

Gyűjtő gél összetétele: 2,1 ml H₂O, 0,5 ml 30 % akrilamid - bisz akrilamid (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 fehérjemintákat 15 percig, 95°C-on, 1x-es SDS felvivő pufferrel inkubáltam, majd a mintákat a gél zsebeibe pipettáztam. A gélek futtatása TGS (Tris-glicin-EDTA) pufferben (25 mM Tris, 192 mM glicin, 0,1 % SDS pH: 8,3), kezdetben 60 Volt feszültséggel, majd a fehérjék szeparáló gélbe érkezése után 120 Volt feszültséggel történt. Futtatás után a gél 30 % etanol és 10 % ecetsav tartalmú oldatban 1 óráig fixáltam. A fixáló oldatot desztillált vizes mosással távolítottam el, majd a gél Coomassie blue festékkel (1 l: 250 ml H₂O, 117,64 ml

85 % foszforsav, 100 g ammónium szulfát, 1,2 g Coomassie blue G250, 200 ml etanol) éjszakán át festettem. A felesleges festéket másnap 1%-os ecetsavas mosással távolítottam el.

3.6.4 Western hibridizáció

Denaturáló poliakrilamid gélelektroforézis után a gél nitrocellulóz membránra (Amersham™ Hybond™-ECL) blottoltam. A blottolást 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) hajtottam végre. Blottolás után a membránt 1 órán át blokkoló oldatban (1 %-os tejpor PBS-T pufferben: 115 mM NaCl, 16 mM Na₂HPO₄, 4 mM KH₂PO₄, 0,1% Tween 20, pH = 7,5) áztattam, hogy megakadályozzam a nem-specifikus fehérjék kötődését. Antitestként 1:10000-es hígításban StrepMAB-Classic-HRP ellenanyagot (IBA) használtam, amivel 1 órán át, szobahőmérsékleten inkubáltam a membránt. Inkubáció után PBS-T pufferrel majd PBS pufferrel mostam a membránt. Előhívó reagensként Enhancer reagens és hidrogén-peroxid 3 ml térfogatú 1:1 arányú keverékét használtam (Pierce, SuperSignal West Pico Rabbit IgG Detection Kit), az inkubáció 1 percig tartott. A kemilumineszcens jelet autoradiográfiás módszerrel tettem láthatóvá (VersaDoc 4000MP (BIO-RAD)).

3.7 Tisztított fehérjék vizsgálata

3.7.1 Fehérje mennyiségi meghatározása Micro-Lowry módszerrel

A fehérje-koncentrációt 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 meghatározandó fehérjeoldatot steril vízzel 100 µl végtérfogatra egészítettem ki, majd 800 µl 0,25 M nátrium-hidroxid oldatot adtam a fehérjeoldathoz, illetve a kalibráló BSA oldatokhoz. 20 perc, szobahőmérsékleten történő inkubáció után 300 µl C reagenst (A reagens: 6 % Na₂CO₃, B reagens: 1,5 % CuSO₄, 3 % Na-citrát, 1:50 arányban), 15 perc elteltével pedig 100 µl D reagenst (72%Folin-reagens) adtam a reakcióhoz. 30 perc elteltével, 1 cm fényúttal rendelkező műanyag küvettában, 750 nm-en, BIORAD SmartSmeC Plus típusú spektrofotométerrel mértem az oldatok fényelnyelését. (Yeang és mts., 1998).

3.7.2 Fehérje abszorpciós spektrum meghatározás

A fehérjetisztítás során előállított periplazma frakció spektrumának, illetve a periplazmából affinitás kromatográfiával tisztított fehérje abszorpciós spektrumának meghatározásához Nicolet Evolution 300 spektrofotométert használtam. A 400 µl, hígított fehérje fényelnyelését 1cm fényúttal rendelkező küvettában, 250-850 nm hullámhosszúságú tartományban mértem.

3.7.3. Tisztított fehérje flavin csoport tartalmának vizsgálata

100 µl tisztított FccAB illetve FccB fehérjét tartalmazó mintát 400 µl 99,5%-os metanollal egészítettem ki. Ezzel párhuzamosan pozitív kontrollként a fehérjével azonos koncentrációjú FAD tartalmú oldatot készítettem 100 µl végtérfogatban, majd ehhez is hozzáadtam 400 µl 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 kvarcküvettában 300-600 nm tartományban.

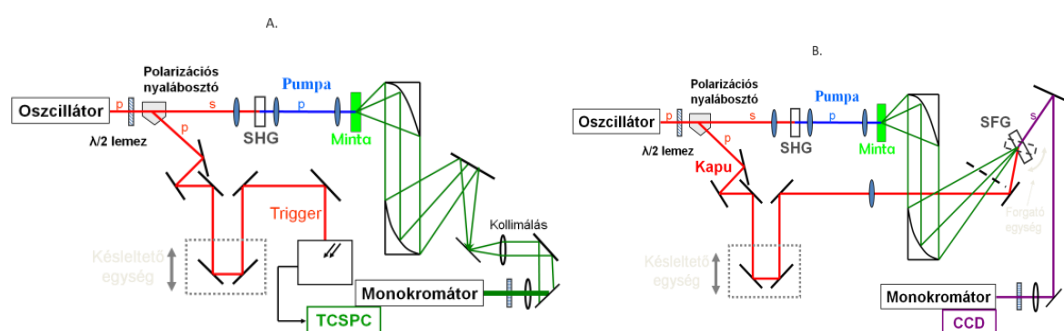
3.7.4 Szulfid függő citokróm c redukáló aktivitás mérés

A tisztított enzim szulfid-függő citokróm c aktivitásának méréséhez szintén Nicolet Evolution 300 típusú spektrofotométert használtam. A 2 ml végtérfogatú reakcióelegyekben történő változást 1 cm fényúttal rendelkező, légmentesen zárható küvettákban mértem. A reakcióelegy kísérletenként különböző mennyiségű tisztított fehérjét, különböző pH-jú 50 mM Tris-HCl puffert, különböző koncentrációjú szarvasmarha szív citokróm c fehérjét, valamint különböző koncentrációjú nátrium-szulfid szubsztrátot tartalmazott. A szulfidot nem tartalmazó reakcióelegyet nitrogén gázzal 5 percen keresztül anaerobizáltam, majd közvetlenül a mérés előtt, szintén anaerob körülmények között előállított, Tris-HCl pufferben feloldott szulfiddal indítottam a reakciókat. A minták fényelnyelését a citokróm c fehérjékre jellemző fényelnyelés maximumán, 550 nm-en vizsgáltam.

3.8 Fluoreszcencia kinetikai mérések FccAB fehérjén

A fluoreszcencia kinetikai mérések az SZBK Biofizikai Intézet Femtobiológiai Laboratóriumában házilag épített készüléken történtek. A műszer két mérési eljárást kombinál, ezáltal rendkívül nagy időablakban történő mérést tesz lehetővé. Az Időkorrelált

egy foton számlálás esetén az időmérés elektronikusan történik. Ez a módszer igen érzékeny, de időfelbontása korlátozott (40 pikoszekundum). A fluoreszcencia felkonvertálás tisztán (nemlineáris) optikai módszer, ahol az időt két optikai nyaláb közötti késleltetés határozza meg. Ennek a módszernek az időfelbontása 250 femtoszekundum, érzékenysége viszont lényegesen alacsonyabb. A gerjesztő fényforrás mindkét esetben egy titán zafír lézer oszcillátor (800 nm, 150 femtoszekundum impulzushossz, 80 MHz ismétlési frekvencia), melyen 400 nm-es nyalábot eredményező frekvenciakétszerezést hajtunk végre (5. ábra).



5. ábra: Időkorrelált egy foton számlálás (A.) és fluoreszcencia felkonvertálás (B.) fluoreszcencia mérés módszerek elrendezése.

4. Eredmények és megvitatásuk

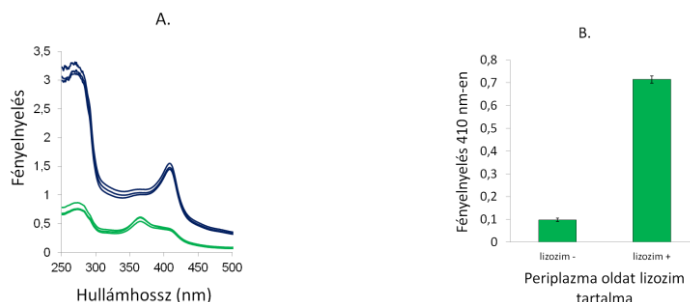
4.1 *T. roseopersicina*-ban történő fehérjetermeltetés hatékonyságának növelése

4.1.1 Periplazma sejtfrakció készítésének optimalizálása

A flavocitokróm c enzim biokémiai, strukturális és kinetikai vizsgálatához nagy mennyiségben kellett előállítanom a megfelelő tisztaságú és töménységű FccAB fehérje heterodimert, ehhez pedig a nagyléptékű fehérjetermelő rendszer optimalizálására volt szükség, mely a fehérje termeltetésének, kinyerésének és tisztításának a hatékonyabbá tételét jelentette.

A flavocitokróm c fehérje egy szolubilis periplazmatikus enzim, melynek *T. roseopersicina* sejtéből való kinyerése korábban szolubilis sejtfrakcióból valósult meg. Azonban előzetes kísérleteim alapján hatékonyabb módszernek bizonyult a periplazma frakcióból való fehérje felszabadítás, melynek optimalizálása érdekében először a periplazma frakció készítéséhez használt oldatban lévő lizozim szükségességét vizsgáltam. A kísérlet

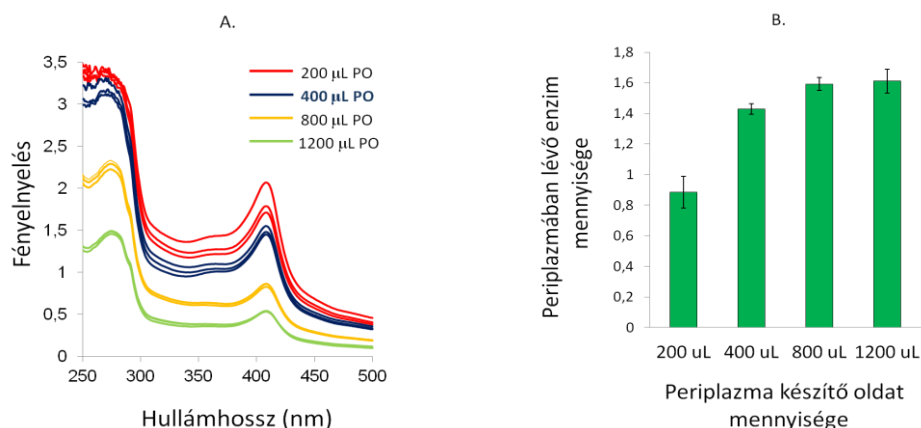
során lizozim tartalmú, illetve lizozimet nem tartalmazó periplazma készítő oldat segítségével nyertem ki a sejtekből az FccAB fehérjét tartalmazó periplazma frakciót, a felszabadított fehérje mennyiségére pedig a periplazma frakció abszorpciós spektrumában megjelenő, oxidált c-típusú citokróm fehérjék hem kofaktorára jellemző, 410 nm-nél megjelenő Soret csúcsból következtettem. A lizozimet tartalmazó periplazma oldat használatakor a sejtekből 7-szer több FccAB fehérjét lehet felszabadítani (6. ábra), így elmondható, hogy a lizozim tartalmú periplazma oldat alkalmazása pozitívan befolyásolja a fehérjekinyerés folyamatát.



6.ábra: (A): Lizozimet nem tartalmazó (zöld) és lizozimet tartalmazó (kék) periplazma készítő oldat alkalmazásával kinyert periplazma frakciók abszorpciós spektruma, illetve azok fényelnyelése 410 nm-en (B).

A 410 nm-nél megjelenő csúcs a flavocitokróm c fehérjéken kívül egyéb szolubilis citokróm c fehérjék elnyeléséből is következhet. Annak bizonyítására, hogy a spektrumból kiemelkedő csúcs megfelelően reprezentálja az FccAB fehérje mennyiségét, negatív kontrollként flavocitokróm c-t nem termelő FOX törzs periplazma frakció spektrumát alkalmaztam.

A fehérjekinyerés hatékonyságának növelését a periplazma készítő oldat (PO) és a feldolgozandó sejtmennyiség arányának változtatásával szándékoztam elérni. A korábbi alkalmazáshoz képest (50 ml kultúrából származó sejtek esetében 400 µl PO) csökkentettem, illetve növeltem a periplazma készítő oldat sejtekhez viszonyított mennyiségét. A felnőtt sejt kultúrát 50 ml-enként 200, 400, 800 és 1200 µl periplazma oldatban dolgoztam fel, majd vizsgáltam a felszabadított flavocitokróm c mennyiségét. Eredményként elmondható, hogy a periplazma oldat mennyiségének növelésével nő a felszabadított FccAB fehérje mennyisége, mely annak köszönhető, hogy a sejtek nagyobb mennyiségű oldatban ozmotikusan jobban telítődnek (7. ábra). A kísérlet során sikerült meghatározni azt a legkisebb periplazma oldat térfogatot (600 µl), mellyel a maximális fehérjekihozatal elérhető. A további kísérletekben a megállapított 600 µl periplazma oldat – 50ml kultúra arányt alkalmaztam.

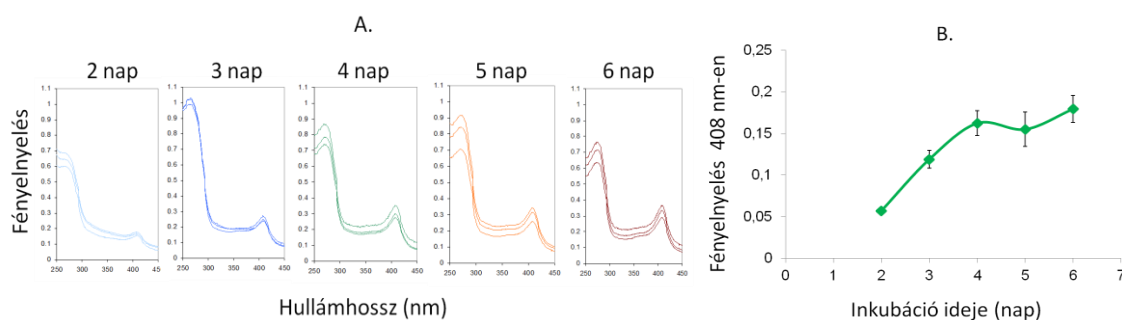


7. ábra: Különböző kultúra:PO arány mellett készített periplazma frakciók abszorpciós spektruma (A), illetve ezen frakciók FccAB fehérje mennyisége (B).

4.1.2 Crt promóterrel irányított fehérje expresszió fokozása *T. roseopersicina*-ban

A fehérjetermelő sejtekben használt Crt promóter szabályozásáról nincs adat, ezért vizsgáltam azokat a növesztési körülményeket, melyek hatással lehetnek a promóter működésére, ezzel együtt pedig a termelt fehérje mennyiségére.

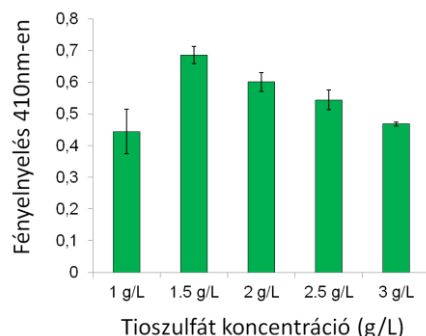
Elsőként a kultúrák növekedési ideje alatt bekövetkező fehérjemennyiség változást vizsgáltam. 6 napon keresztül követtem nyomon a sejtek fehérjetermelő képességét, a legnagyobb felszabadítható fehérjemennyiséget 4. napos kultúránál értem el (8. ábra), ennek hátterében az elektronforrásként a tápoldathoz adott tioszulfát fogyás állhat, melynek következtében a sejtek anyagcseréje, így fehérjetermelő képessége is csökken. Továbbiakban a 4. tenyésztési napon végeztem a kísérleteket.



8. ábra: Különböző napig nevelt kultúrák periplazma frakcióinak spektrumai (A), illetve FccAB fehérje mennyisége (B).

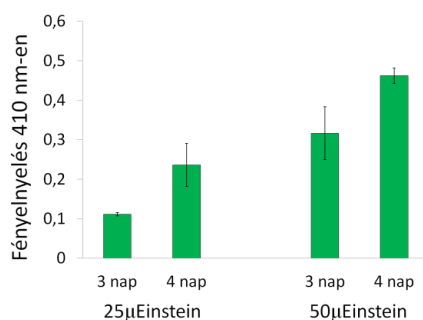
Korábbi kísérletek során kimutatták, hogy a *T. roseopersicina* növesztésére alkalmas PC tápoldatban lévő tioszulfát csökkentése esetén (4 g/l-ről 2 g/l-re) a flavocitokróm expressziós szintje növekszik (Balogh T. személyes közlés), ezért megvizsgáltam a tioszulfát koncentráció sejtnövekedésre illetve fehérjetermelésre gyakorolt hatását. Eredményeim

alapján a fehérjetermelés szempontjából legoptimálisabb tiosulfát koncentrációnak az 1,5 g/l-es bizonyult (9. ábra).



9. ábra: Különböző tiosulfát koncentráción nevelt kultúrák periplazma frakcióinak fényelnyelése.

A rekombináns FccAB fehérjét kódoló génekről történő mRNS átíródásról a szekvencia előtt elhelyezkedő Crt promóter gondoskodik. A Crt promóter a fotoszintetikus pigmentek szintézisében részt vevő enzimeket kódoló gének átíródásában szerepet játszó bakteriális promóter, melynek fotoszintézisben betöltött szerepe fényszabályozás alatti működést feltételez, ezért a termeltetendő FccAB fehérje mennyiségének növelése érdekében vizsgáltam a fényintenzitás Crt promóterre, illetve fehérjeexpresszióra gyakorolt hatását. A baktérium kultúrákat különböző fényintenzitás mellett (25 és 50 μ Einstein) különböző inkubációs ideig (3 és 4 nap) neveltem, majd periplazma sejtfrakciót készítettem. A kísérlet eredményeként elmondható, hogy a magasabb intenzitású besugárzás (50 μ Einstein) növelte a fehérjetermelés mértékét (10. ábra).

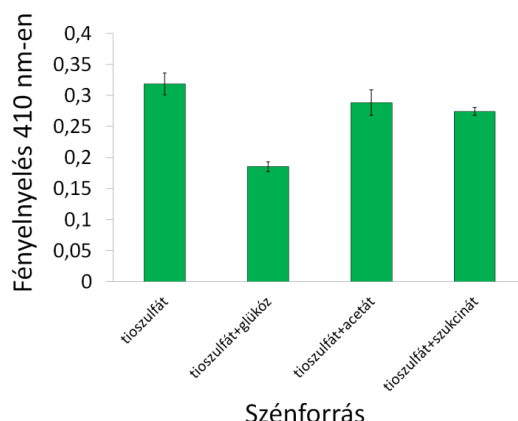


10. ábra: Különböző fényintenzitáson nevelt kultúrák periplazma frakcióinak fényelnyelése.

A fehérjetermelés hatékonyságának növelését célzó utolsó kísérlet a különböző elektronforrások Crt promóterre gyakorolt hatásának vizsgálata volt.

A sejteket 1,5 g/l koncentrációjú tiosulfátot tartalmazó, továbbá hozzáadott C-forrásként: glükózzal (2,5 g/l), acetáttal (1 g/l) vagy szukcináttal (2,5 g/l) kiegészített tápoldatban neveltem. Ezen kultúrák periplazma frakcióból arra következtettem, hogy a

fehérjetermelés szempontjából a leghatásosabb a tioszulfát, mint egyedüli C-forrás alkalmazása volt (11. ábra).



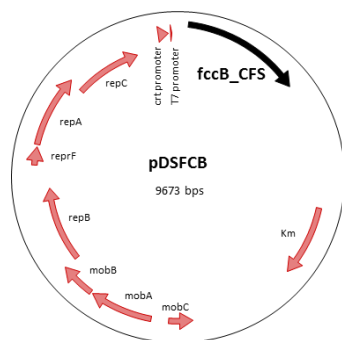
11. ábra: Különböző szénforráson nevelt kultúrák periplazma frakcióinak fényelnyelése.

A megfelelő tenyésztési paraméterek meghatározásával (4 napos inkubáció, 50 μ Einstein fényintenzitáson történő növesztés, 1,5g/l tioszulfát tartalmú tápoldatban történő szaporítás) sikerült optimalizálni a *T. roseopersicina* sejtek fehérjetermelő képességét, így lehetőség nyílt az FccAB fehérje nagyléptékű termeltetésére.

4.2 Rekombináns FccB fehérjét termelő *T. roseopersicina* törzs (FOB) létrehozása

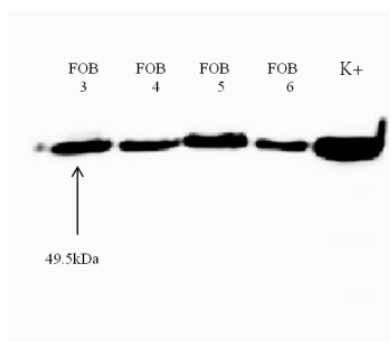
A korábban elkészített vad típusú FccAB fehérjét kódoló expressziós vektor mellé célt volt egy kizárólag flavocitokrómmal nagy alegységet (FccB) kódoló expressziós vektor létrehozása. Ehhez a *T. roseopersicina* genomjában lévő *fccB* gént PCR reakció útján, FCCBO16F és FCCBO16R primerpárok alkalmazásával kromoszómális DNS templárról Phusion polimeráz enzim segítségével sokszoroztam fel. Az előállított PCR termékek (1303bp, *fccB*) 5' végi foszforilálását T4 polinukleotid kináz enzimmal végeztem el. A fragmenteket EcoRV restrikciós endonukleázzal hasított és FastAP alkalikus foszfatázzal kezelt pBtSK+ vektorba építettem, a fragmentet tartalmazó vektort pedig XL1-Blue *E.coli* sejtbe transzformáltam. A transzformánsok szelekciója ampicillint tartalmazó LB lemezen történt. Az *fccB* gént tartalmazó pBSFCB plazmidot az ampicillint tartalmazó LB tápoldatban felnőtt transzformáns sejtekből izoláltam, majd NdeI és SacI restrikciós endonukleázokkal hasítottam. A hasítás útján létrejött FccB alegységet kódoló DNS fragmentet agaróz gélelektroforézis után gélből történő fragmentizálással nyertem ki, majd szintén NdeI és SacI restrikciós endonukleázzal hasított és alkalikus foszfatázzal kezelt pDSK6CrtKm

expressziós vektorba (Balogh T. személyes közlése) építettem be úgy, hogy a gén azonos leolvasási keretben fúzionálva legyen a vektorban lévő Strep-II és FLAG affinitás peptideket kódoló szakasszal. A ligálás útján létrejövő, *fccB* gént tartalmazó pDSFCB vektort (12. ábra) XL-1-Blue *E.coli* sejtbe transzformáltam, a transzformánsokat kanamicin tartalmú LB lemezen szelektáltam, majd FCCBO16F és OMHEC2R primerpárok segítségével kolónia PCR útján ellenőriztem a transzformáció sikerességét. A transzformánsokból plazmidot izoláltam, az expressziós vektorba épített DNS szakasz megfelelő orientációját pedig HindIII restrikciós endonukleázzal történő emésztéssel ellenőriztem. A létrejövő, Fcc nagy alegységét kódoló expressziós vektor (pDSFCB) szekvenciáját szekvenálással ellenőriztem.



12. ábra: Flavocitokróm c enzim nagy alegységét (FccB) kódoló expressziós vektor (pDSFCB).

Az általam létrehozott pDSFCB expressziós vektort *E.coli* S17 sejtbe transzformáltam, majd konjugációval juttattam be a *T. roseopersicina* FOX (Δhyn , Δhup , Δfcc) törzsbe. Az így létrehozott *T. roseopersicina* FOB törzs alkalmas volt a rekombináns FccB fehérje termeltetésére, melyet a különböző FOB sejtvonalak fehérjetermelő képességének vizsgálatával ellenőriztem Western hibridizáció segítségével. A rekombináns FccB fehérjék azonosítása StrepII affinitás peptid ellenanyaggal valósult meg (13. ábra).



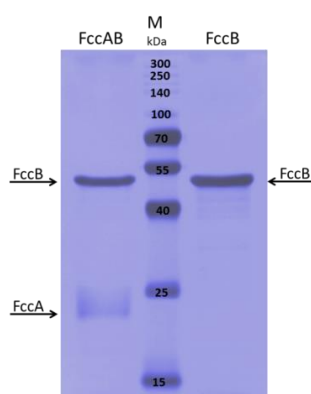
13. ábra: FOB törzsek fehérjetermelő képességének ellenőrzése. K+: pozitív kontrol, tisztított FccAB enzim.

4.3 Flavocitokróm c variánsok expressziója, tisztítása és jellemzése

4.3.1 FccAB és FccB fehérjék termelése és tisztítása

A vizsgálni kívánt FccAB fehérje és az általam létrehozott, vad típussal összehasonlíthatni kívánt FccB fehérje nagy léptékű termeltetését *T. roseopersicina* modellorganizmusban szándékoztam megvalósítani. Az optimális tenyésztési paraméterek mellett nagy mennyiségben felnevesztett, FccAB és FccB fehérjéket termelő FOXF és FOB kultúrákból az általam meghatározott módon periplazma frakció készítettem, majd a StrepII affinitás peptidet hordozó Fcc variánsokat nagy kötőkapacitással rendelkező Strep-Tactin Superflow High Capacity (IBA) oszloptöltetet alkalmazva, affinitás kromatográfiával tisztítottam. A fehérjék molekulásúly szerinti meghatározását SDS-PAGE segítségével végeztem. A tisztított FccAB esetén megfigyelhető egy 49,5 kDa molekulásúlyú sáv, mely a flavocitokróm c nagyalegysége, illetve egy 22,3 kDa mérettartományban elmosódottabb sáv, mely a flavocitokróm c kisalegysége, ezzel szemben az FccB fehérje mintában egyedül a 49,5 kDa nagyságú flavocitokróm c nagyalegysége látható (14. ábra).

Eredményként elmondható, hogy mind az FccAB fehérje, mind az FccB fehérje *T. roseopersicina*-ban nagy mennyiségben termeltethető, könnyen kinyerhető és sikeresen, homogenitásig tisztítható.



14. ábra: FccAB és FccB fehérjék molekulásúly szerinti meghatározása SDS-PAGE segítségével. M: maker.

4.3.2 FccAB és FccB fehérjék abszorpciós spektrumának vizsgálata

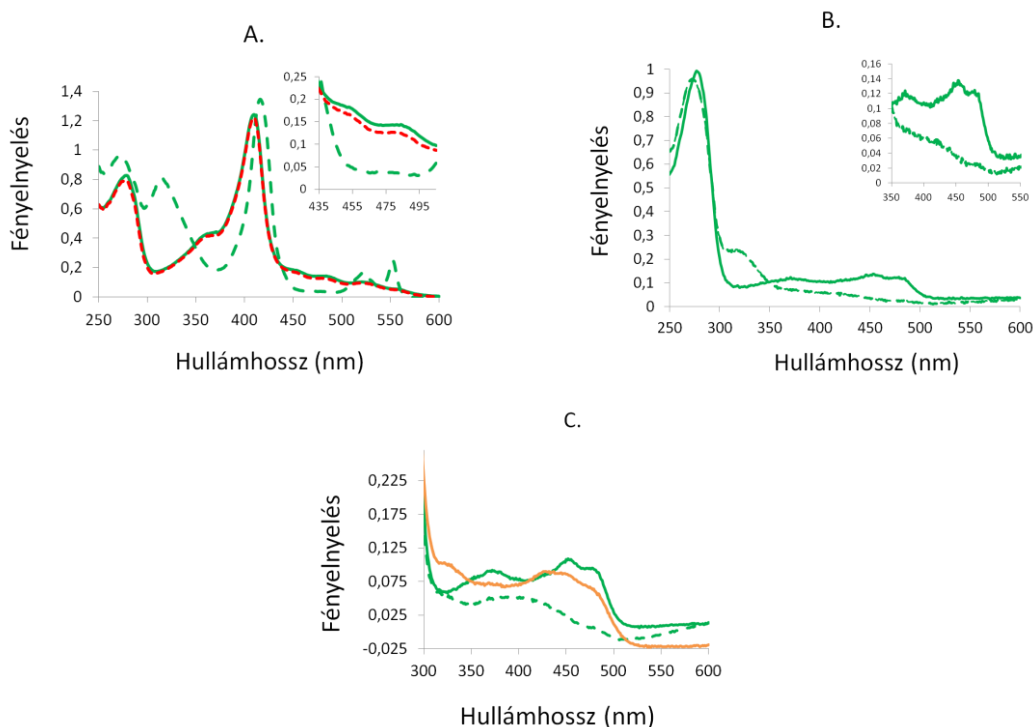
A tisztított rekombináns FccAB fehérjének jellegzetes fényelnyelése van, abszorpciós spektrumában megfigyelhető az oxidált c típusú citokróm fehérjék hem kofaktorára jellemző, 410 nm-nél megjelenő Soret csúcs, illetve az oxidált, flavin tartalmú fehérjékre jellemző 450 nm-en és 480 nm-en megjelenő csúcsok (Morris és mts., 1994). A kizárólag FAD kötő nagy alegységből álló FccB fehérje abszorpciós spektrumában esetében a flavin tartalmú fehérjékre jellemző két csúcs figyelhető meg, továbbá azonosítható a FAD-ra jellemző 360 nm

hullámhossznál megjelenő abszorpciós maximum, amelyet az FccAB esetén a Soret-csúcs elfed.

Korábbi kísérletek során sikerült kimutatni, hogy az oxidált állapotban lévő FccAB fehérje abszorpciós spektruma nátrium-ditionit redukáló szer illetve szulfid hozzáadásának hatására megváltozik. A 410 nm-nél megjelenő elnyelési csúcs eltolódik és 418 nm-re, a 450 és 480 nm-es vállak kioltódnak, illetve megjelenik két új csúcs 523 és 552 nm-en. Mindez a hem csoportok és a FAD kofaktor redukciójára utal.

A fenti információkat igazolva vizsgáltam az általam tisztított FccAB és az újonnan létrehozott FccB fehérjék nátrium-ditionit általi redukcióját. Az FccAB fehérje redukálásakor a már korábban leírt változások voltak megfigyelhetők (15. ábra/A.). Az FccB fehérje esetében szintén látható az oxidált, flavin tartalmú fehérjékre jellemző elnyelési csúcsok eltűnése (15. ábra/B.), így elmondható, hogy a csak nagy alegységet tartalmazó FccB fehérje nátrium-ditionit redukálószer hozzáadásával redukálható (15. ábra).

A kísérlet során megfigyeltem, hogy aerob mérési körülmények között a nátrium-ditionit redukálószer reakcióelegybeli fogyása után – melyet a nátrium-ditionitra jellemző 330 nm-en megjelenő elnyelési csúcs eltűnésével követtem nyomon – az FccAB fehérje csak kis ideig maradt redukált állapotban, a redukálószer teljes elfogyása után a fehérje visszatért eredeti, oxidált állapotába (15. ábra/A.). Ezzel ellentétben az FccB visszaoxidálódása nagyon lassan ment végbe, illetve megreked egy félig oxidált félig redukált állapotban, viszont kálium-ferrocianid oxidálószer hozzáadásával sikerült újra teljesen oxidált formába hozni (15. ábra/C.).

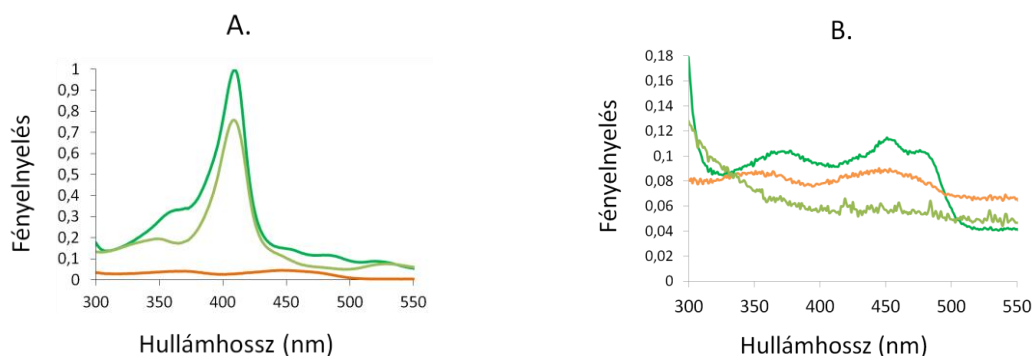


15. ábra: (A): Oxidált (zöld sima), redukált (zöld szaggatott) majd visszaoxidálódott (piros szaggatott) FccAB fehérje spektruma, (B): Oxidált (zöld sima) és redukált (zöld szaggatott) FccB spektruma, (C): oxidált (zöld sima), redukált (zöld szaggatott) és kálium-ferrocianiddal visszaoxidált (narancssárga) FccB spektruma.

4.3.3 Flavocitokróm c variánsok FAD kofaktorának vizsgálata

Irodalmi adatok szerint a szulfid kinon-oxidoreduktáz típusú enzimekben található FAD kofaktor a fehérjén belül kovalensen kötött, illetve kovalensen nem kötött formában is elhelyezkedhet. A *T. roseopersicina* flavocitokróm c enzimen belüli FAD kötéséről nincs adat.

A tisztított FccAB és FccB fehérjék és flavin csoportjuk közötti kötés minőségét FAD kofaktor felszabadítás útján kívántam meghatározni. A kofaktor kivonása a fehérjék metanolos forralásával valósult meg. Forralás után az elegyet centrifugáltam, majd vizsgáltam a centrifugálás után létrejött felülúszó abszorpciós spektrumát. Sem az FccAB, sem az FccB felülúszójának spektrumából nem volt kimutatható az oxidált FAD kofaktorra jellemző jellegzetes elnyelési csúcsok (16. ábra), kontrollként a fehérjével azonos koncentrációjú FAD oldatot alkalmaztam. A vizsgálat eredménye alapján azt a következtetést vontam le, hogy a denatúrálódott fehérjékkel együtt a FAD kofaktor is a csapadék fázisban maradt, amelyet a csapadék sárgás színezete is alátámasztott. A kísérlet során bebizonyosodott, hogy a flavocitokróm c variánsok FAD kofaktorát nem lehet metanolos forralás útján felszabadítani, mivel az kovalensen kötött formában van jelen a fehérjékben.



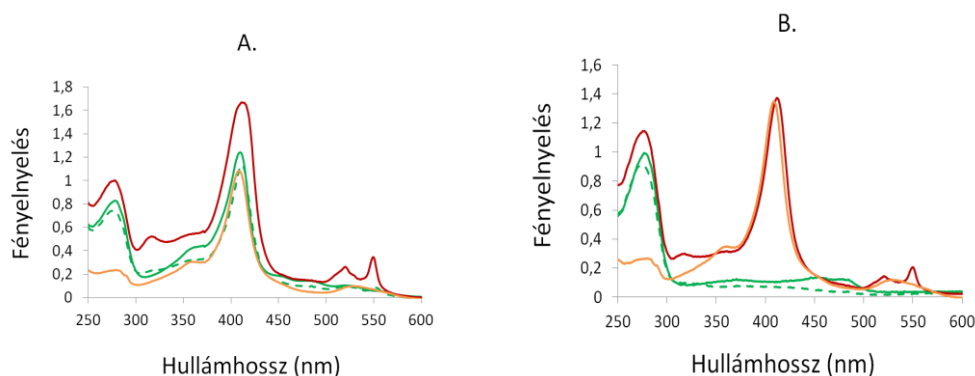
16. ábra: (A): FccAB spektruma (sötétzöld), kontrollként használt FAD oldat spektruma (sárga), kezelt FccAB spektruma (világoszöld), (B): FccB spektruma (sötétzöld), FAD oldat spektruma (sárga), kezelt FccB spektruma (világoszöld).

4.4 Flavocitokróm c enzim aktivitásának vizsgálata

4.4.1 Flavocitokróm c variánsok citokróm c redukáló aktivitása

Irodalmi adatok szerint a flavocitokróm c enzim *in vitro* szulfid-függő citokróm c redukciót katalizál.

Az előállított FccAB és FccB fehérjék citokróm c redukáló aktivitásának igazolása érdekében a következő kísérletet terveztem és hajtottam végre: tisztított FccAB és FccB fehérjéket nátrium-ditionit hozzáadásával elredukáltam, majd miután megbizonyosodtam a ditionit rendszerből való eltűnéséről, elektronakceptorként oxidált citokróm c fehérjét jutattam a rendszerbe, melynek meghatároztam a spektrumát kontrollként alkalmazva. A fehérje és a citokróm c molárisan azonos mennyiségben alkalmaztam, a folyamatot pedig spektrofotométer segítségével követtem nyomon. A ditionit hozzáadása után az FccAB (17. ábra/A), mind az FccB (17. ábra/B) fehérjék elredukálódtak, majd a ditionit elfogyása után egyértelműen látszik, hogy a fehérjékben lévő elektronokkal a hozzáadott oxidált citokróm c fehérje redukált állapotba került (eltolódott Soret csúcs (~417 nm) illetve ~523 és ~552 nm-en megjelenő elnyelési csúcs) továbbá ezzel egyidejűleg a fehérjék visszaoxidálódnak (17. ábra). Eredményként elmondható, hogy mind az FccAB heterodimer mind az FccB monomer fehérje képes citokróm c fehérjéket redukálni.



17. ábra: (A): Oxidált FccAB spektrum (zöld), redukált FccAB spektrum (szaggatott), redukált citokróm c (piros), kontrol oxidált citokróm c (narancssárga) fehérje spektruma; (B): Oxidált FccB spektrum (zöld), redukált FccB spektrum (szaggatott), redukált citokróm c (piros), kontrol oxidált citokróm c (narancssárga) fehérje spektruma.

4.4.2 Szulfid-függő citokróm c redukció aktivitásmérés optimalizálása

A tisztított fehérjék citokróm c redukáló aktivitásának bizonyítása mellett szükség volt a már korábban vizsgált, ám pontatlan és reprodukálhatatlan szulfid-függő citokróm c aktivitás mérés optimalizálására, melyet az FccAB enzimmel végeztem

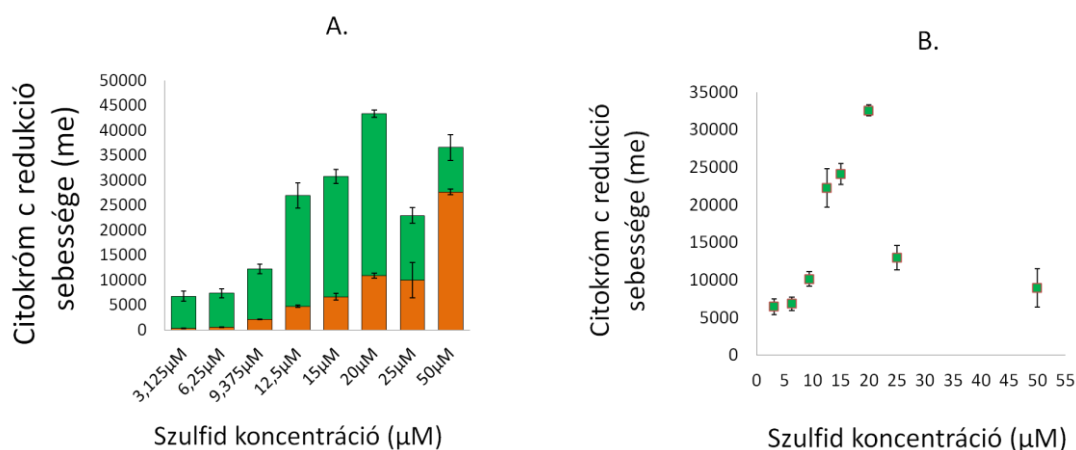
A pontatlanság és reprodukálhatatlanság mellett gondot jelentett az enzimaktivitás mérés alatt lezajló, két, párhuzamosan működő folyamat elkülönítése is. Tehát célom volt az abiotikus folyamat (szulfid képes redukálni citokróm c fehérjét) illetve a biotikus folyamat (az enzim által katalizált citokróm c redukció) éles elválasztása.

A szulfid-függő citokróm c redukciót a reakcióban használt szarvasmarha citokróm c fehérjék redukáltsági szintjének nyomon követésével vizsgáltam 550 nm-en spektrofotométer segítségével.

Az enzimaktivitás citokróm c szubsztrátfüggésének meghatározása, illetve a méréshez szükséges optimális enzimmennyiség megállapítása érdekében a reakciókban különböző mennyiségű FccAB enzimet (0 μg , 0,5 μg , 1 μg , 2 μg) és különböző koncentrációjú szarvasmarha citokróm c fehérjét (12,5 μM , 25 μM , 50 μM) alkalmaztam. A reakciók kiértékelése során, sikerült megállapítanom az enzim és a citokróm c fehérje szubsztrát reakcióelegybeli optimális koncentrációját. A reprodukálható és pontos aktivitásméréshez szükséges legkisebb citokróm c koncentrációnak a 12,5 μM bizonyult, míg a legmagasabb reakciósebességet 2 μg enzim esetén mértem. Mivel a mérés 2 μg enzim alkalmazásakor sokszor pontatlan eredményt hozott, így a pontosabb mérhetőség érdekében az optimális

enzimmennyiségnek 1 μg -ot állapítottam meg. A reakcióelegyet Tris-pufferben ($\text{pH} = 9,0$) állítottam össze, míg a reakció szulfid koncentrációja 12,5 μM volt.

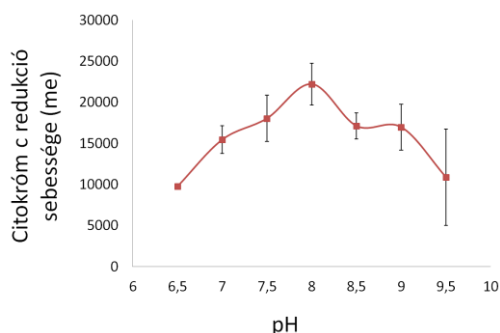
Az optimalizált enzim, illetve citokróm c koncentráció meghatározása után szükség volt az enzimaktivitás szulfid-függésének meghatározására is, ehhez növekvő szulfid koncentrációt (3,125 μM - 50 μM) alkalmaztam. A reakció 20 μM szulfid hozzáadása esetén érte el a legnagyobb sebességet, majd a szulfid koncentráció további emelésével az enzimaktivitás csökkenése volt megfigyelhető (18. ábra), mely alátámasztja azt az elképzelést, miszerint az FccAB *in vivo* enzimaktivitásának alacsony szulfid koncentráció mellett lehet kiemelkedő jelentősége (18. ábra/B.). Az enzimmentes és enzimet tartalmazó reakciókat párhuzamosan vizsgálva elmondható, hogy a szulfid koncentráció emelésével a háttérreakció sebessége folyamatosan nőtt (18. ábra/A.). Legoptimálisabb szulfid mennyiségnek a 12,5 μM -os koncentrációt választottam, mivel a megfelelő enzimsebesség mellett a párhuzamosan folyó enzimmentes reakció a 20 μM -os szulfid koncentrációnál mérthez képest kevésbé volt számottevő.



18. ábra: Az FccAB által katalizált citokróm c redukció szulfid függése.

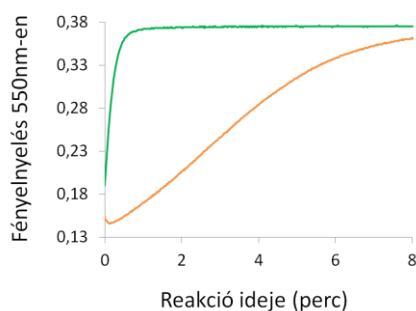
(A): FccAB enzimaktivitás maximális reakciósebessége (zöld), illetve az enzimmentes háttérreakció maximális reakciósebessége (sárga), (B): FccAB enzimaktivitás szulfid-függése a háttérreakció kivonásával.

Az enzimaktivitás pH függésének meghatározásakor a már sikeresen optimalizált paramétereket (1 μg Fcc, 12,5 μM citokróm c, 12,5 μM) alkalmaztam, a reakciókat pedig különböző pH-jú Tris-pufferben ($\text{pH} = 6,5$ – $\text{pH} = 9,5$) állítottam össze. A különböző pH-n vizsgált reakciók közül a $\text{pH} = 8,0$ pufferben összeállított reakció adta a legjobb eredményt, az enzim ezen a pH-n bizonyult a legaktívabbnak (19. ábra), így elmondható, hogy az FccAB enzimaktivitás pH optimuma $\text{pH} = 8,0$.



19. ábra: FccAB enzim szulfid-függő citokrómm c redukáló aktivitásának pH-függése.

Az FccAB komplex biokémiai és kinetikai vizsgálata során alkalmazott reakciókörülmények optimalizálásával (1 μ g Fcc, 12,5 μ M citokrómm c, 12,5 μ M szulfid, pH = 8,0) sikerült kidolgoznom a flavocitokrómm c enzimre alkalmazható pontos és reprodukálható enzimaktivitás mérési eljárást melynek során sikeresen elválasztható egymástól az enzim által katalizált biotikus, illetve az enzim jelenléte nélkül lezajló abiotikus folyamat (20. ábra).

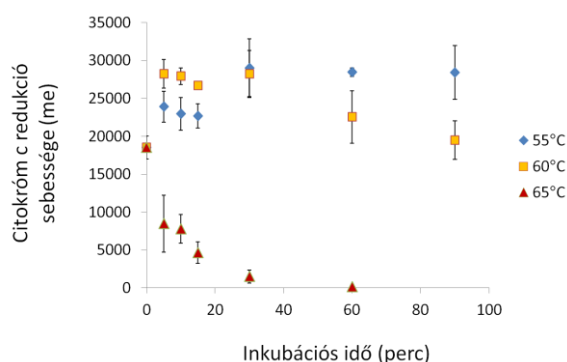


20. ábra: Enzimet nem tartalmazó szulfid-függő citokrómm c redukció lefutása (narancssárga), enzimet tartalmazó szulfid-függő citokrómm c redukció (zöld) kinetikája.

Annak ismeretében, hogy a fluoreszcencia kinetikai vizsgálatok során a vizsgálandó enzim lézer fény általi sugárzásnak, ezzel együtt pedig nagy hőhatásnak van kitéve, szükség volt az FccAB enzim hőstabilitásának meghatározására is.

Az FccAB enzim hőstabilitásának vizsgálata során a fehérjemintákat különböző hőfokon (55°C, 60°C, 65°C) 0-90 percig inkubáltam, majd az általánosan alkalmazott aktivitásmérési módszerrel vizsgáltam a fehérjében bekövetkező esetleges változásokat. 55 illetve 60°C-on a fehérje aktivitásában nem történt változás, 65°C-on azonban az aktivitás gyors csökkenés következett be (21. ábra).

A kísérlettel sikeresen igazoltam, hogy az FccAB egy mérsékelt hőstabil fehérje, ennek következtében pedig képes tolerálni a fluoreszcencia kinetikai vizsgálat során fellépő hőmérséklet-emelkedést.



21. ábra: FccAB enzim hőstabilitásának vizsgálata.

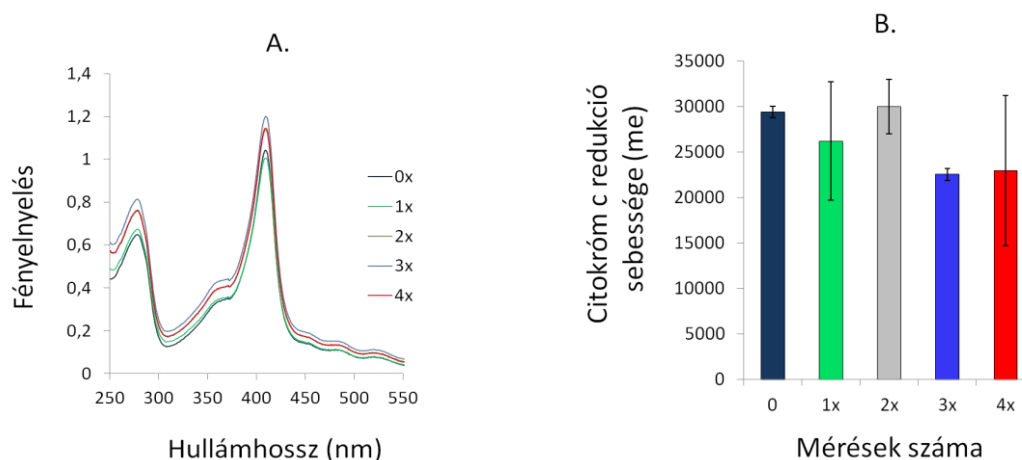
4.5 Ultragyors fluoreszcencia kinetikai vizsgálatok

Az előállított flavocitokróm c variánsok FAD csoportjának vizsgálatát az SzBK Biofizikai Intézet Femtobiológiai Kutatócsoportjával való kollaboráció keretén belül terveztem megvalósítani. A FAD kofaktor izoallaktozin gyűrűje fénnel gerjeszthető, fluoreszcencia kinetikájának lecsengése pedig függ a kofaktor-fehérje közötti kapcsolat erősségétől. Szoros kapcsolat esetén a gerjesztett FAD molekuláról a fehérjére történő energiaátadás gyorsabb, ezért a lecsengési idő mérése információt adhat a fehérje és FAD molekula közötti kapcsolat erősségéről. A FAD kofaktor fluoreszcencia kinetikájának extrém gyors lecsengésére kialakított, újszerű, nagy felbontású, ultragyors fluoreszcencia kinetikai mérés kifejlesztése tette lehetővé a flavocitokróm c variánsok FAD kofaktor és annak fehérjekörnyezete közötti kapcsolat vizsgálatát.

A méréshez szükséges fehérje előállítása után két módszer segítségével – időkorrelált egy foton számlálás módszerével illetve fluoreszcencia felkonvertálás mérési módszerrel – történtek meg az első mérések.

Egy fehérjemintán többször történt hosszú ideig tartó fluoreszcencia kinetikai mérés, amelynek során a mérőberendezésben egy üvegapillárison folyamatosan átáramoltatott FccAB minta a lézerfény fénypályáján áthaladva gerjesztődik, a gerjesztési energia egy részét hő formájában adják le a fehérjék, ami a minta lokális felmelegedését eredményezi. Ennek következtében a mért fehérjemintában esetlegesen bekövetkező változásokat a fehérje spektrumának illetve aktivitásának az egyes méréseket követő vizsgálatával nyomon követtem. A többször megmért fehérje abszorpciós spektrumában és aktivitásában számottevő

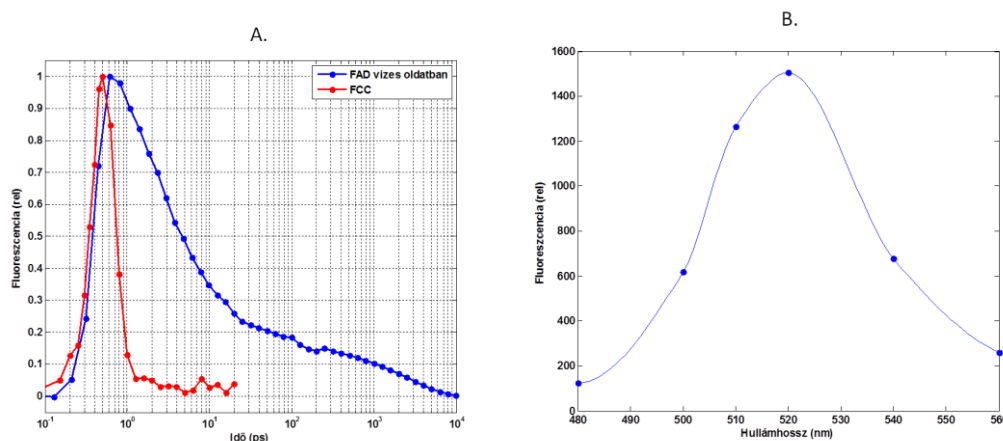
változás nem volt megfigyelhető (22. ábra), ami igazolta, hogy az FccAB fehérjén elvégezhető a nagy időfelbontású fluoreszcens kinetika mérés.



22. ábra: (A.): Ultragyors fluoreszcencia kinetikai vizsgálat során mért FccAB abszorpciós spektrumok, (B.): FccAB maximális reakciósebessége a különböző mérések után.

A mérés során megfigyelhető volt a fehérjeminta kismértékű párologása és ennek következtében koncentrációja, melynek mértékére szintén a mérések után felvett fehérjespektrum változásából következtettem (22. ábra/A.). A minta töményedését minden mérés előtt a fehérjeminta eredeti koncentrációra történő vissza hígításával korrigáltuk.

A mérés eredményeként elmondható, hogy az FccAB-hez kötött FAD fluoreszcencia kinetikájának spektrális eloszlása a kinetikai maximumnál (500 fs) jól megfelelt az ismert FAD spektrumnak (23. ábra/B.), illetve a fehérjéhez kötött FAD fluoreszcencia életideje a környezettel való erős kölcsönhatás következtében rendkívül lerövidült a vizes közegben oldott FAD molekulákéhoz képest (23. ábra/A.), mely a FAD kofaktor-fehérje közötti igen erős kölcsönhatás bizonyítéka. Az alkalmazott mérési módszer tehát alkalmas volt a fehérjéhez kötött FAD molekula rendkívül gyors, femtoszekundomos nagyságrendű gerjesztési és lecsengési fluoreszcencia kinetikájának meghatározására. Elmondható továbbá, hogy az ultragyors fluoreszcencia kinetikai vizsgálat többszöri ismétlés után sem okozott maradandó változást a fehérjében, ennek következtében a tisztított FccAB fehérje alkalmas mintának bizonyult FAD kofaktor vizsgálatára. A mérések a közeljövőben folytatódni fognak az FccB fehérje fluoreszcencia tulajdonságainak meghatározásával, ami lehetővé fogja tenni többek között a flavocitokróm c fehérjék kis alegysége szerepének vizsgálatát az FccB fehérjéhez kötött FAD molekulákra.



23.ábra: (A.): Fluoreszcencia kinetika vízben oldott és FccAB-hez kötött FAD esetében. Gerjesztés 400 nm, detektálás 520 nm (spektrális maximum). (B.): Fcc FAD kofaktor fluoreszcencia kinetikájának spektrális eloszlása a kinetikai maximumnál (500 fs).

5. Összefoglalás

Diákköri munkám során sikeresen optimalizáltam a *T. roseopersicina* sejtek flavocitokróm c fehérjetermelő képességét a megfelelő tenyésztési paraméterek (tenyésztési idő, fényintenzitás, tiosulfát tartalom) beállításával. A termelt fehérje sejtekből való kinyerésének hatékonyabbá tételéhez optimalizáltam a periplazma frakció készítés módszerét, melyet a periplazma frakcióból kinyert fehérje affinitás kromatográfiás eljárás segítségével történő tisztítása követett. Ezeknek az optimalizált módszereknek köszönhetően nagy mennyiségben, kellő töménységben és tisztaságban előállított FccAB enzim alkalmassá vált az enzimkinetikai és a fluoreszcencia kinetikai vizsgálatokra.

Az Fcc komplex biokémiai vizsgálata során sikerült meghatároznom az FccAB által katalizált szulfid-függő citokróm c redukció enzim mennyiség függését, a szulfid illetve citokróm c szubsztrátok reakcióelegybeli optimális koncentrációját, továbbá sikerült megállapítanom az FccAB enzim működésének pH optimumát is.

Az optimalizált reakciókörülmények alkalmazásával sikerült az FccAB enzimre alkalmazható pontos és reprodukálható enzimaktivitás mérési eljárást kidolgoznom.

Az enzim hőstabilitását vizsgálva bizonyítottam, hogy az FccAB egy mérsékelten hőstabil fehérje, így képes tolerálni a fluoreszcencia kinetikai vizsgálat során fellépő hőmérséklet-emelkedést.

Az Fcc enzim flavoprotein alegységének ultragyors fluoreszcens kinetikai vizsgálatához létrehoztam egy kizárólag Fcc nagy alegységet tartalmazó, FccB fehérjét termelő

T. roseopersicina törzset (FOB), melynek segítségével sikerült az FccB enzimet nagy töménységben és megfelelően tiszta formában előállítanom. Az FccB biokémiai vizsgálata során igazoltam, hogy a fehérje ebben a formában is redox aktív, kovalensen kötött FAD kofaktort tartalmaz, illetve szintén rendelkezik citokróm c redukáló aktivitással, tehát összehasonlítható az FccAB-val, információkkal szolgálhat a kis- és nagyalegység kapcsolatáról.

A fehérjék előállítása után az első ultragyors fluoreszcencia kinetikai vizsgálatok megtörténtek, a vizsgálatokkal párhuzamosan végzett enzimaktivitás mérések során pedig sikerült bebizonyítani, hogy az FccAB fehérje aktivitása többszöri mérés után sem változik meg. A fluoreszcencia kinetikai mérések szerint az FccAB fehérjedimerben lévő FAD gerjesztést követő fluoreszcenciája rendkívül gyors lecsengésű, ami nagyon szoros fehérje-kofaktor kapcsolatra utal.