

7. Nyilatkozat

Alulírott Németh Brigitta, biológus MSc szakos hallgató, kijelentem, hogy a Diákköri dolgozatomban foglaltak saját munkám eredményei, és csak a hivatkozott forrásokat (szakirodalom, eszközök, stb.) használtam fel.

Szeged, 2014. 11. 13.

.....
aláírás

8. Felhasznált irodalom

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

Argyrou, A., Vetting, M.W., Blanchard, J.S. Characterization of a new member of the flavoprotein disulfide reductase family of enzymes from *Mycobacterium tuberculosis*. J Biol Chem. (2004) 279(50):52694-702.

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

Brito JA, Sousa FL, Stelter M, Bandejas TM, Vonrhein C, Teixeira M, Pereira MM, Archer M. Structural and functional insights into sulfide:quinone oxidoreductase. Biochemistry. (2009) Jun 23;48(24):5613-22.

Brune DC. Isolation and characterization of sulfur globule proteins from *Chromatium vinosum* and *Thiocapsa roseopersicina*. Arch Microbiol. 1995 Jun;163(6):391-9.

Cherney MM1, Zhang Y, Solomonson M, Weiner JH, James MN. Crystal structure of sulfide:quinone oxidoreductase from *Acidithiobacillus ferrooxidans*: insights into sulfidotrophic respiration and detoxification. J Mol Biol. (2010) Apr 30;398(2):292-305.

Cooper, C.E., Brown, G.C., The inhibition of mitochondrial cytochrome oxidase by the gases carbon monoxide, nitric oxide, hydrogen cyanide, and hydrogen sulfide: chemical mechanism and physiological significance. J. Bioenerg. Biomembr. (2008) 40:533-539.

Dahl C, Schulte A, Stockdreher Y, Hong C, Grimm F, Sander J, Kim R, Kim SH, Shin DH. Structural and molecular genetic insight into a widespread sulfur oxidation pathway. J Mol Biol. (2008) Dec 31;384(5):1287-300

Gogotov IN, Zorin NA, Kondrat'eva EN. Purification and properties of hydrogenase from phototrophic bacterium *Thiocapsa roseopersicina*. Biokhimiia. (1976) May;41(5):836-42

Helmy, N., Buus, C.P., Vons, C., Lenoir, V., Abou-Hamdan, A., Guedouari-Bounihi, H., Lombés, A., Bouillaud, F. Oxidation of hydrogen sulfide by human liver mitochondria, Nitric Oxide (2014) 2014 Sep 15;41:105-12

Kabil O, Banerjee R. Redox biochemistry of hydrogen sulfide. J Biol Chem. (2010) 285(29):21903-7.

Kolluru, G.K., Shen, X., Kevil, C.G., A tale of two gases: NO and H₂S, foes or friends for life? Redox Biology (2013) 313-318.

Lencina, A.M., Ding, Z., Schurig-Briccio, L.A., Gennis, R.B. Characterization of the Type III sulfide:quinone oxidoreductase from *Caldivirga maquilingensis* and its membrane binding

Marcia, M., Elmer, U., Peng, G., Mitchel, H. A new structure-based classification of sulfide:quinone oxidoreductases. *Proteins* (2009) 78:1073-1083.

Marcia, M., Elmer, U., Peng, G., Mitchel, H. The structure of *Aquifex aeolicus* sulfide:quinone oxidoreductase, a basis to understand sulfide detoxification and respiration. *PNAS* (2009) 106:9625-9630.

Marcia, M., Langer, J.D., Parcej, D., Vogel, V., Peng, G., Mitchel, H. Characterizing a monotopic membrane enzyme. Biochemical, enzymatic and crystallization studies on *Aquifex aeolicus* sulfide:quinone oxidoreductase. *Biochimica et Biophysica Acta* (2010) 1798:2114-2123

Olson KR, Whitfield NL. Hydrogen sulfide and oxygen sensing in the cardiovascular system. *Antioxid Redox Signal.* (2010) 10:1219-34.

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

Pham VH, Yong JJ, Park SJ, Yoon DN, Chung WH, Rhee SK. Molecular analysis of the diversity of the sulfide : quinone reductase (sqr) gene in sediment environments. *Microbiology.* (2008)154:3112-21.

Reinartz M, Tschäpe J, Brüser T, Trüper HG, Dahl C. Sulfide oxidation in the phototrophic sulfur bacterium *Chromatium vinosum*. *Arch Microbiol.* (1998)170(1):59-68.

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

Schoepp-Cothenet B, Lieutaud C, Baymann F, Verméglio A, Friedrich T, Kramer DM, Nitschke W. Menaquinone as pool quinone in a purple bacterium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 May 26;106(21):8549-54.

Theissen U1, Martin W. Sulfide:quinone oxidoreductase (SQR) from the lugworm *Arenicola marina* shows cyanide- and thioredoxin-dependent activity. *FEBS J.* (2008) 275(6):1131-9.

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

Wang, R. Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB J* 16 (2002) 1792-1798.

9. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom elsősorban Dr. Rákhely Gábor tanszékvezető egyetemi docensnek, amiért munkámhoz a körülményeket megteremtette,

Mérhetetlen hálával tartozom témavezetőmnek Dr. Tóth Andrásnak témavezetéséért, türelméért, hasznos elméleti és gyakorlati tanácsaiért, és szigorú nevelő szándékaiért, mellyel pontosságra és precizításra nevelt közös munkánk során.

Szintén mérhetetlen hálával tartozom Duzs Ágnesnek, türelméért, barátságáért, kitartásáért mellyel megajándékozott engem közös munkánk során.

Továbbá köszönettel tartozom a SZTE TTIK Biotechnológiai tanszék valamint az MTA SZBK Biofizika intézet összes munkatársának, aki munkájával hozzájárult ahhoz, hogy ez a dolgozat elkészülhessen.

10. Rövidítések jegyzéke

µg: mikrogramm

µl: mikroliter

µM: mikromól

bp: bázis pár

ATP: Adenozin-trifoszfát

DMSO: dimetil-sulfoxid

DNS: dezoxi-ribonukleinsav

dUQ: decilubikinon

DQ: durokinon

EDTA: etiléndiamin-tetraecetsav

FAD: flavin-adenin-dinukleotid

Fcc: flavocitokróm c

HABA: hidroxi-azofenil-benzoidsav

kDa: kiloDalton

Km: kanamicin

LB: Luria-Bertani

ml: milliliter

MD: menadion

MQ4: menakinon-4

MQ7: menakinon-7

nm: nanométer

OD: optikai denzitás

PAGE: poliakrilamid gélelektroforézis

PC: Pfenning-féle tápoldat

PCR: polimeráz láncreakció (Polymerase Chain Reaction)

rpm: fordulatszám / perc

SDS: nátrium-dodecilszulfát (Sodium Dodecil Sulfate)

SQR: szulfid kinon oxidoreduktáz

TAE: Tris-Acetát-EDTA

TBS: Tris-Base-Nátrium klorid (Sodium chloride)

TGS: Tris-Glicin-SDS

11. Tételes szerzői hozzájárulás

Alulírott Németh Brigitta a dolgozatban leírt munkafolyamatok közül a:

- *T. roseopersicina*, *E. coli* sejtek növesztését,
- plazmid DNS izolálást,
- DNS szerkezeti módosításokat (irányított mutagenesis, restrikciós emésztés, polinukleotid kináz kezelés, alkalikus foszfatáz kezelés, ligálás),
- agaróz gélelektroforézist,
- DNS fragment izolálást gélből,
- PCR reakciót,
- *T. roseopersicina*, *E. coli* transzformációt,
- fehérje termelő sejtek feltárását, membrán frakció létrehozást
- fehérje szolubilizálást és tisztítást affinitás kromatográfiával,
- denaturáló és natív poliakrilamid gélelektroforézist,
- Western hibridizációt,
- fehérje abszorpciós spektrumának meghatározását
- tisztított fehérjék flavin csoport tartalmának vizsgálatát
- a tisztított fehérjék szulfid függő kinon redukáló aktivitás mérését végeztem el.

.....
aláírás

Szeged, 2014. 11. 13.

11. Mellékletek

1. melléklet

Eukarióta Sqr szignál peptid		I	II	C	V.típusú Sqr sapka hurok	
A.aeolicus Sqr(1)	-----MAKHVVVIGGGYGG	DANTVTQSG-----KKIEYDYLVIATG	SIC-T	GA-	-----IPGVSCFG-PAYE	
A.ferrooxidans Sqr(1)	-----MAHVVLGGGTGG	EAQNTILADG-----STVHYDYLMIATG	SIC-T	GA	-----MAGASCFG-PAYE	
H.sapiens Sqr(2)	-----VTGSGFQSSAMIAFASTHHKVLVVGSSAG	DRNCIHDDDD-----EKISYRYLLIATG	SNY-S	TF-	-----PNPFVKCAG-APQK	
S.pombe Sqr(2)	-----VTGSGFQSSAMIAFASTHHKVLVVGSSAG	RENKIVTQSG-----QELISYDYLMAAG	TIY-S	TQ	-----PSGLK CAG-APQK	
C.tepidum Sqr(3)	-----MSKKIVVLGAGTAG	ERKEVKTKN-----HFTYDYLVIATG	TFY-Y	NT-	-----AELPFKCFV-APIE	
S.solfataricus Sqr(3)	-----MAKVIIAGNFIAG	ANHSVQTADG-----VSHSYDYLVIITG	TVY-E	NT	-----AKLPHRCFV-APIE	
A.vinosum Sqr(4)	-----MARILLGAGISG	DGGAGHSPFTVETDPTAGSQSEYDYLVIATG	SVC-T	GT	-----GHGMCTCQG-AAPE	
T.roseopersicina Sqr	-----MARILLGAGISG	EGGAGHNDPVVTIETDAERAGQTEYDYLVIATG	SVC-T	GT	-----GHGMCTCQG-AAPE	
C.tepidum Sqr(4)	-----MAKVVLGAGISG	EGDANISKGVTIETDEHAGSYTVDYDYLVIATG	SVC-T	GT	-----GHMATCQG-AAPE	
S.solfataricus Sqr(5)	-----MLRSMTKVLVIGAREGG	SGGLVYTKPD-----GKAAEDYDYLIIATG	SVC-E	SGGLFYQKSPKP--KVPENYVPVADAAC	CEG-PIFE	
C.tepidum Sqr(5)	-----MKTEHVLILGSEFAG	ESKKVTIQPTE-----REGTTDVLTYDYLVIATG	TVS-D	GSAREPHQGTGK	-----LDFVMAKAA	CEG-PPVE
A.aeolicus Sqr(6)	-----MAKVVLGAGISG	QNKVHLKSGK-----VIEDFDYLVIATG	SICGS	SGGS	-----GNPKDKTAVGRPVPE	
C.tepidum Sqr(6)	-----MKVVLILGGGIAG	SRDSVTLKAG-----QRSDFDYLVIATG	SICGA	GFG	-----GNPKDPSAVGGGPE	
T.roseopersicina Sqr	-----MHRITIVSGFAG	DORTLETTAG-----PVENDGLVIGSSG	TPCEG	GFA	-----GNPNPSSMGGGPIFE	
IIIIa I. típusú Sqr s.h.						
IIIIb						
A.aeolicus Sqr(1)	VNCF-----QNPYKNIFSGVVVAIPPIEKP-----IPFGVPTGMIE	SAICIAADGE	C	amfipatikus helix-turn-helix motívum	C-terminális hurok	
A.ferrooxidans Sqr(1)	VDEHQ-----RSKKYANIFAAGIAIAPPVETIP-----VPTGAPKTGMIE	NAVCFADMGD				
H.sapiens Sqr(2)	DKETL-----QRRYPNVFGIGDCNLP-----TSKTAAYA	YTSCPLVTGY				
S.pombe Sqr(2)	DQSTL-----QSTREFNVFAIGDCSLP-----TSKTYAAT	YTSCPLLTGY				
C.tepidum Sqr(3)	HNNTL-----KALKHDGVYVIGDAINVY-----TSKAGSVAH	HSTCFIVYVK				
S.solfataricus Sqr(3)	DKETL-----RMKDHSNVYVMSGDANDLP-----VSKAGSTAD	DVLCYIATGT				
A.vinosum Sqr(4)	DADYNPKFEENSKADWEKTYQTPYKNIFAIPIAIPAPPHIISKVMKSGSLQISFTPTPTGMPSA	GAACVASTGM				
T.roseopersicina Sqr	DADYEFKEDWGFKDWKTYQTPYKNIFAVGIAIAPPHIISKVMKSGANGTINFTPTPTGMPSA	GAACVASTGS				
C.tepidum Sqr(4)	DADYTAKPFGEWANDWPTIYQTPMYSNIVAAAGIAPAPPHISIKEMTSTVNGRQIFFTPTPTGMPSG	GAACIVSAGF				
S.solfataricus Sqr(5)	DLNMY-----SINYDNYAVGDANSLT-----VPLGLYAV	TLICVADNEF				
C.tepidum Sqr(5)	NKQLK-----NPDYPEVVAAGDAARACT-----VPLKLSIGH	EVICIGDMGD				
A.aeolicus Sqr(6)	EETCQ-----VVGVEWAXAIGDSAIEGFP-----WTAKQGHIAE	NILCLIMDMW				
C.tepidum Sqr(6)	DDFCR-----VVGVDGWAVGDSALGEP-----WKAKQGHIAE	NVLCVMDTGD				
T.roseopersicina Sqr	DAHCR-----VPGYENVYVAGDSGSFGPD-----WMPKQAMAD	ELVCIVDAND				

I II III: FAD kötő motívumok

2. melléklet – Felhasznált baktérium törzsek

Név	Genotípus	Referencia
<i>E. coli</i> törzsek		
NovaBlue	<i>recA1 gyrA96</i> (F' <i>lacIq</i> Z) Tcr	Strategene
S17-1 lambda pir	294 (<i>recA pro res mod</i>) Tpr Smr (pRP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7)	Herrero és mts., 1990
<i>T. roseopersicina</i> törzsek		
FOQRON	$\Delta hynSL$, $\Delta hupSL$, ΔFcc , ΔSqn , ΔSqr	Rákhely és mtsi. személyes közlés
FRNSQNN	$\Delta hynSL$, $\Delta hupSL$, ΔFcc , ΔSqn , ΔSqr + pDSQNNNS	Duzs és mtsi. személyes közlés
FRNSQNNC121A	$\Delta hynSL$, $\Delta hupSL$, ΔFcc , ΔSqn , ΔSqr + pDSQNNSC121A	ez munka
FRNSQNNC272A	$\Delta hynSL$, $\Delta hupSL$, ΔFcc , ΔSqn , ΔSqr + pDSQNNSC272A	ez munka
FRNSQNNC333A	$\Delta hynSL$, $\Delta hupSL$, ΔFcc , ΔSqn , ΔSqr + pDSQNNSC333A	ez munka
FRNSQNNM156A	$\Delta hynSL$, $\Delta hupSL$, ΔFcc , ΔSqn , ΔSqr + pDSQNNSM156A	ez munka
FRNSQNNM156C	$\Delta hynSL$, $\Delta hupSL$, ΔFcc , ΔSqn , ΔSqr + pDSQNNSM156C	ez munka

3. Melléklet – Felhasznált primerek

Név	Szekvencia
ONC121AF	5' – CACGCCATCACGCCTGCCGAGGGCATCGCTGC – 3'
ONC121AR	5' – GCAGCGATGCCCTCGGCAGGCGTGATGGCGTG – 3'
ONC121AE	5' – AGCACGCCATCACGCCTGC – 3'
ONCM156AF	5' – CGAGCCGAGCTCGTGCCGCGGCGGACCCATC – 3'
ONCM156AR	5' – GATGGGTCCGCCGCGGCACGAGCTCGGCTCG – 3'
ONCM156AE	5' – CAACGAGCCGAGCTCGTGC – 3'

ONCM156CF	5' – CGAGCCGAGCTCGGCGCGCGGCGGACCCATC – 3'
ONCM156CR	5' – GATGGGTCCGCCGCGCGCCGAGCTCGGCTCG – 3'
ONCM156CE	5' – CAACGAGCCGAGCTCGGC – 3'
ONC272AF	5' – GCAGGCTGATGCCCATGCCCCGTGTCCCCGGCTAC – 3'
ONC272AR	5' – GTAGCCGGGGACACGGGCATGGGCATCAGCCTGC – 3'
ONC272AE	5' – TGCAGGCTGATGCCCATGC – 3'
ONC333AF	5' – CAAGGTCGAGCTGGTCGCCATCGTCGACGCCAACG – 3'
ONC333AR	5' – CGTTGGCGTCGACGATGGCGACCAGCTCGACCTTG – 3'
ONC333AE	5' – CAAGGTCGAGCTGGTCGC – 3'
T7promoter	5' – TAATACGACTCACTATAGG – 3'
T7terminator	5' – CTAGTTATTGCTCAGCGG – 3'