

XXXII. OTDK Biológia Szekció

**Szerkezeti és működési vizsgálatok egy VI. típusú
szulfid kinon oxidoreduktáz enzimen**

Németh Brigitta

III. éves Biológus MSc

MTA SZBK Biofizikai Intézet

SZTE TTIK Biotechnológiai Tanszék

Témavezető:

Dr. Tóth András tudományos munkatárs

2014



Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	2
1. Bevezetés.....	4
1.1. A szulfid szerepe az élővilágban.....	4
1.2. A szulfid oxidáló enzimek.....	5
1.3. A szulfid kinon oxidoreduktáz típusú fehérjék csoportosítása.....	6
1.4. Fototróf bíbor kénbaktériumok	8
1.5. <i>Thiocapsa roseopersicina</i>	9
1.6. Szulfid oxidáló enzimek <i>T. roseopersicina</i> -ban.....	9
2. Célkitűzések	11
3. Anyagok és módszerek.....	12
3.1. Felhasznált baktérium törzsek.....	12
3.2. Felhasznált primerek	12
3.3. Mikroorganizmusok tenyésztése	12
3.3.1. <i>E. coli</i> növesztési körülmények.....	12
3.3.2 Növesztési körülmények <i>Thiocapsa roseopersicina</i> törzsekhez.....	12
3.4 DNS módosítással kapcsolatos munkák.....	12
3.4.1.Plazmid DNS izolálás <i>Escherichia coli</i> -ból	12
3.4.2. DNS szerkezet módosítások.....	13
3.4.3. Agaróz gélelektroforézis	14
3.4.4. DNS fragment izolálás agaróz gélből.....	14
3.5 Baktériumok transzformálása.....	14
3.5.1 <i>Escherichia coli</i> transzformálása	14
3.5.2 <i>Thiocapsa roseopersicina</i> transzformálása	14
3.6. Fehérje termeltetés és tisztítás.....	15
3.6.1. Sejtfeltárás	15
3.6.2. Membrán frakció előállítása.....	15
3.6.3. A fehérjék felszabadítása a membránból	16
3.6.4. Fehérje tisztítás affinitás kromatográfiával	16
3.7 Tisztított fehérjék vizsgálata	16
3.7.2 Fehérje abszorpciós spektrum meghatározás	16
3.7.3 Szulfid függő kinon redukáló aktivitás mérés.....	16
3.8. Poliakrilamid gélelektroforézis technikák	17
3.8.1. Denaturáló poliakrilamid gélelektroforézis.....	17
3.8.2. Natív poliakrilamid gélelektroforézis	17

3.8.3. Western hibridizáció	18
4. Eredmények.....	19
4.1. Hatékony, reprodukálható, léptéknövelhető módszer kidolgozása a <i>T. roseopersicina</i> Sqn fehérje tisztítására.....	19
4.2. A vad típusú fehérje redox aktív kofaktor tartalmának igazolása	22
4.3. Az Sqn fehérje biokémiai jellemzése	23
4.3.1. Az Sqn kinon szubsztrát specifitási spektrumának vizsgálata	23
4.3.2. A pH hatása az Sqn szulfid függő kinon redukáló aktivitására.....	23
4.3.3. A hőmérséklet hatása az Sqn szulfid függő kinon redukáló aktivitására	24
4.3.4. Az Sqn kinetikai paramétereinek meghatározása.....	25
4.4. Az Sqn fehérje negyedleges szerkezetének vizsgálata.....	25
4.5. Az aktív centrumot kialakításában és a FAD kötésében szerepet játszó aminosavak azonosítása Sqn fehérjében	26
4.5.1. <i>T. roseopersicina</i> szulfid kinon reduktáz 2 (Sqn) aminosav mutáns fehérjéket termelő expressziós vektorok elkészítése	26
4.5.7. A pontmutációt hordozó Sqn fehérjéket termelő törzsek létrehozása.....	28
4.5.8. A pontmutációt hordozó Sqn fehérjék vizsgálata	28
5. Diskusszió.....	31
5.1. A fehérjetisztítási módszer fejlesztése	31
5.2. A vad típusú fehérje redox aktív kofaktort tartalmának igazolása természetes elektron donorral	31
5.3. A vad típusú Sqn fehérje biokémiai jellemzése	31
5.4. A negyedleges szerkezet vizsgálata	32
5.5. Az Sqn enzim által végzett katalízisben feltehetőleg szerepet játszó aminosavak azonosítása	33
6. Összefoglalás.....	35

1. Bevezetés

A szervetlen kénvegyületek az élet kialakulásától napjainkig hatással vannak az élőlényekre. Az elemi kén legredukáltabb formája, a szulfid már az élet megjelenése előtt jelen volt a Földön. A szulfid minden élőlényre toxikus, azáltal hogy képes gátolni a légzési láncot, azonban a szulfid oxidáló enzimek segítségével nem csupán kivédhető a szulfid toxicitása, hanem segítségükkel a szulfid elektrondonorként is szolgálhat kemolitotróf mikroorganizmusok számára. A szulfid oxidáló enzimek jelentőségét mutatja, hogy az élővilág legtöbb fejlődési fokán elterjedtek, köztük baktériumokban, archaebaktériumokban és a növények kivételével az összes eukariótában megtalálhatóak.

Az említett enzimek közé tartoznak a szulfid kinon oxidoreduktázok (SQR) valamint a flavocitokróm c szulfid dehidrogenáz (FCCSD), melyek az ősi diszulfid oxidoreduktáz fehérje család tagjai, és közös jellemzőjük az aktív centrum kialakításában résztvevő FAD kofaktor tartalom. A szulfid oxidáló enzimeket filogenetikai kapcsolataik és konzervált aminosavak elhelyezkedése alapján 7 alcsaládba lehet sorolni, melyek közül hat csoportba az SQR enzimek, míg a hetedik típusba a FCCSD fehérjék szulfid kötő alegysége tartozik. Fototróf bíbor kénbaktériumokban az SQR enzimek működésük során elektronokat juttatnak a membrán kinon raktárba, ezáltal a szulfid képes hasznosulni az energiakonzerváló folyamatokban.

A *Thiocapsa roseopersicina* egy változatos kénanyagcserével rendelkező fototróf bíbor kénbaktérium, mely a fotoszintézishez szükséges elektronokat elsősorban redukált kénvegyületekből (szulfid, elemi kén, tioszulfát, szulfit) nyeri. A *T. roseopersicina* genomjában 3 szulfid oxidáló enzimet kódoló gént azonosítottak: flavocitokróm c (*fcc*), szulfid kinon oxidoreduktáz 1 (*sqr*) illetve a szulfid kinon oxidoreduktáz 2 (*sqn*). Az *Sqr* egy IV. típusú, míg az *Sqn* egy VI. típusú szulfid kinon oxidoreduktáz fehérje, amelyek egy-egy eddig még nem jellemzett SQR alcsalád képviselői. Ennek következtében vizsgálatuk nagy jelentőségű az SQR típusú enzimek teljesebb megismerése szempontjából.

1.1. A szulfid szerepe az élővilágban

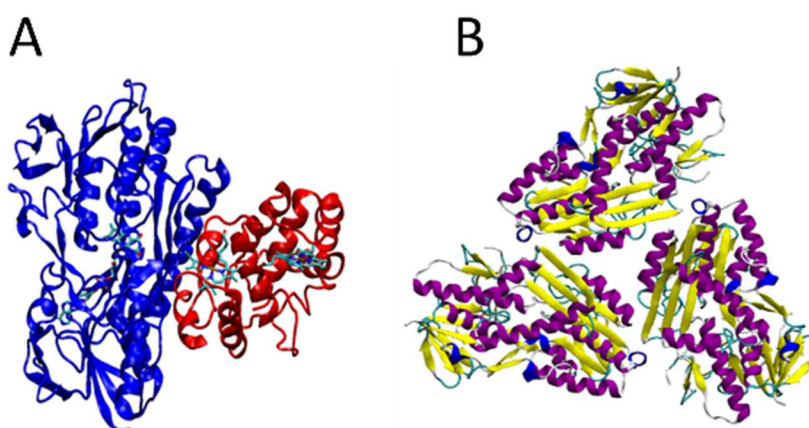
Az elmúlt évtizedek kutatásai a szulfid biológiai szerepével kapcsolatban rávilágítottak, hogy a szulfid egy fiziológiás szempontból rendkívül lényeges szerepet betöltő vegyület, hisz több létfontosságú folyamat szabályozásában vesz részt: a vaszkuláris homeosztázis és az angiogenezis folyamatában. A szulfid képződhet enzimatisz úton a cisztein lebontás melléktermékeként, és nem enzimatisz úton is tioszulfátból, tiociszteinből illetve szulfitból (Kolluru és mtsi 2013).

A nitrogén monoxid és a szénmonoxid után a szulfid volt a harmadikként felismert gáz alapú neurotranszmitter. Mindhárom vegyület toxikus hatással bír, azáltal hogy a légzési láncot képes gátolni (Wang 2002, Cooper és mtsi 2008). A szulfid azonban alacsony koncentrációban szubsztrát is a sejtek számára (Olson és mtsi, 2010). A szulfid képes elektron donorként szolgálni foto- és kemolitotróf baktériumoknak, melyek a szulfid hasznosítását a szulfid oxidáló enzimeik segítségével érik el (Kabil és mtsi 2010).

1.2. A szulfid oxidáló enzimek

A szulfid oxidáló enzimek csoportjába tartoznak a szulfid kinon oxidoreduktáz (SQR) típusú fehérjék illetve a flavocitokróm c szulfid dehidrogenáz, melyek az ősi diszulfid reduktáz fehérje család tagjai (Marcia és mtsi 2009).

A flavocitokróm c szulfid dehidrogenáz egy szolubilis, periplazmatikus lokalizációjú heterodimer fehérje, melyben a flavin kofaktort tartalmazó nagy alegység (FccB) végzi a szulfid oxidációját, a kis alegység (FccA) pedig egy hem kötő citokróm c típusú fehérje (1. ábra „A”) (Brune 1995).



1. ábra – (A) *Allochromatium vinosum* flavocitokróm c nagy alegység (kék) és kis alegység (piros) térszerkezete (Chen és mts., 1994) (B) *Aquifex aeolicus* Sqr enzym térszerkezete (Marcia és mtsi 2009)

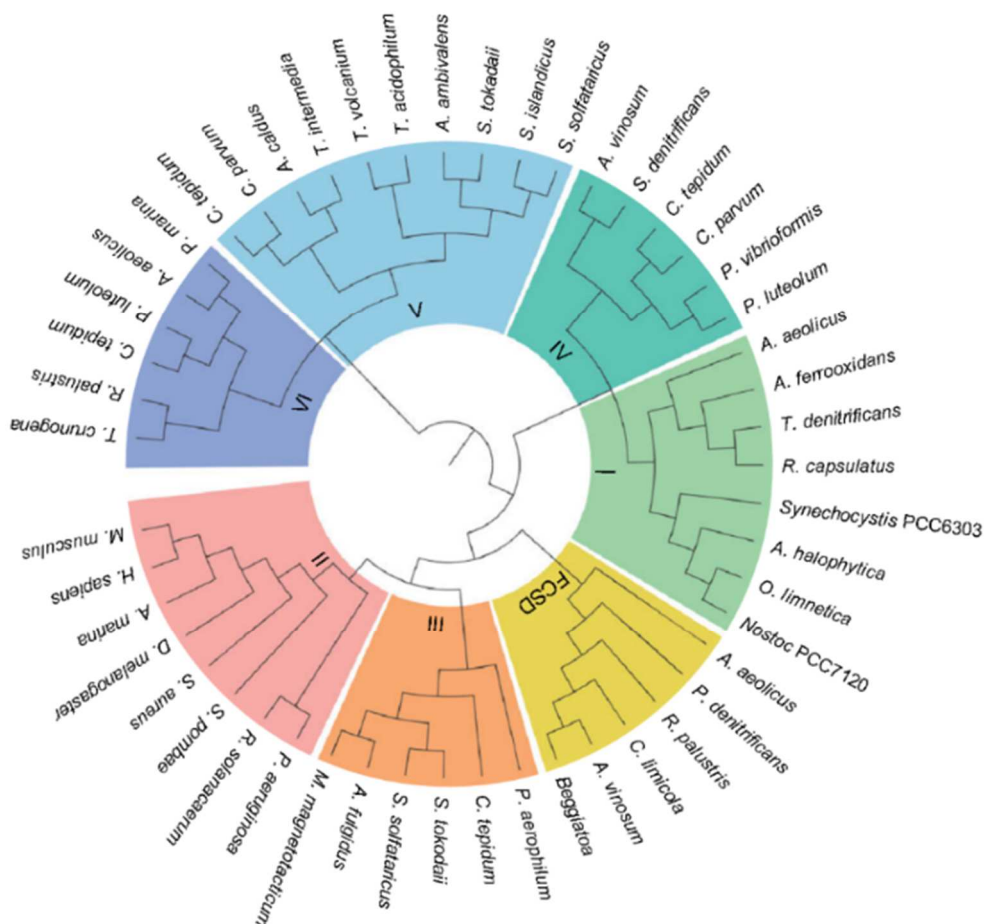
A szulfid kinon oxidoreduktáz fehérjék monotipikus – azaz csak a foszfolipid kettős réteg egyik oldalán elhelyezkedő – membrán kötött flavoproteinek, melyeknek egyetlen kofaktora, az aktív centrumban található flavin adenin dinukleotid (FAD). A prokariótákban található szulfid kinon oxidoreduktáz fehérjék nem tartalmaznak ismert szignál szekvenciát, ami a sejtmembránon történő átjutást biztosítaná, ellenben a kísérletes eredmények alapján elmondható, hogy a C–terminális régiójuk szerepet játszhat a fehérje komplex membránba való bejutásában (Lencia és mtsi 2012).

Az ismert térszerkezetű SQR enzimek (pl. *Aquifex aeolicus* Sqr, 1. ábra „B”) kristályszerkezetből arra a megállapításra jutottak, hogy a fehérjekristályban homodimer illetve

homotrimer forma is jellemző (1. ábra „B”) (Marcia és mtsi 2010). A fehérje komplexek kialakításáért, valamint a kinon kötésért is feltehetőleg a C–terminális régió a felelős (Lencia és mtsi 2012).

1.3. A szulfid kinon oxidoreduktáz típusú fehérjék csoportosítása

A szulfid kinon oxidoreduktáz enzimek rendkívül ősi fehérjék. A SQR fehérjékben konzervált aminosavak és motívumok találhatóak. Az egyes konzervált aminosavak megléte, hiánya, vagy épp más aminosavval történő helyettesítése alapján 6 alcsoportba lehet sorolni az SQR fehérjéket. Ezen csoportok megfelelnek az SQR fehérjék evolúciója során kialakult fő fejlődési ágaknak, melyekben a konzervált régiók feltehetőleg hasonló funkciókat látnak el. Ilyen funkciók lehetnek az aktív centrum kialakításában résztvevő FAD kötése, a szulfid kötés és oxidáció, a kinon kötés és redukció, az oligomerizáció, valamint a fehérje membránba való bejuttatása (Marcia és mtsi, 2009).



2. ábra – A szulfid oxidáló enzimek filogenetikai fája és csoportosítása (Marcia és mtsi, 2009).

I. típusú SQR fehérjék

Az I. típusú SQR fehérjék családjába tartozó fehérjék megtalálhatóak az α - és β Proteobacteria, a Cyanobacteria csoportban valamint az *Aquificales* csoportban. Közös

jellemzőjük, hogy affinitásuk a szulfidhoz mikromoláris nagyságrendű, valamint hogy fiziológiás szerepük szerint elektronokat juttatnak a III. respirációs komplexbe a szulfid függő fotoszintézishez. Egyedi tulajdonságuk a 294-312 aminosav régióban megtalálható rendezetlen szerkezetű szekvencia („sapka hurok”), amely feltételezések szerint az enzim elektron donor szubsztrát szelektivitását biztosítja. *A. aeolicus* Sqr fehérjében a FAD kötésében legfontosabb elem a polipeptidláncban 124. pozícióban található, a kofaktorról kovalens kötést kialakító cisztein. A 156. és a 347. pozícióban lévő ciszteinek a szulfid oxidációjában szerepet játszó redox aktív páros, míg a szulfid aktív helyre történő juttatását 155. pozícióban lévő szerin, a 294. pozícióban lévő valin és a 311. pozícióban lévő prolin biztosítja (Marcia és mtsi 2009).

II. típusú SQR fehérjék

A II. típusú SQR fehérjék talán a legszélesebb körben elterjedtek: képviselik magukat a Bacteria csoporton belül a Firmicutes és a Proteobacteria csoportokban, de megtalálhatóak eukariótákban is, többek között élesztőben, férgekben, ízeltlábúakban és emlősökben. A csoportba tartozó bakteriális SQR fehérjék homológiát mutatnak az eukarióták mitokondrionális SQR fehérjéivel. Szulfidhoz való affinitásuk milimoláris nagyságrendű. Fiziológiás szerepük nem minden esetben tisztázott, azonban emlősökben a szulfid neurotranszmitterként betöltött szerepéhez is kapcsolódik működésük, az idegszövetek szulfid szintjének megfelelő szinten tarása révén. Az I. típusú SQR fehérjékkel szemben nem rendelkeznek „sapka hurokkal”, továbbá az *A. aeolicus* Sqr fehérjéjének 124. pozícióban található cisztein FAD kötésben betöltött szerepét a II. típusú SQR enzimekben egy tirozin tölti be egy 8- α -O-tirozil kötésen keresztül (Marcia és mtsi 2009).

III. típusú SQR fehérjék

A III. típusú SQR enzimek ismertek zöld kénbaktériumokban (Chlorobiaceae) valamint Archeobaktériumokban (Sulfolobales). A csoport egyetlen részletesebben jellemzett képviselője a *Caldivirga maquilensis* baktériumban található SQR enzim. A biokémiai jellemzés alapján elmondható, hogy a szulfidhoz való affinitása az I. típusú SQR fehérjékhez hasonlóan mikromoláris nagyságrendű (Lencina és mtsi 2012) továbbá a II. típusú SQR fehérjékhez hasonlóan nem rendelkezik „sapka hurokkal”.

IV. típusú SQR fehérjék

A IV. típusú SQR fehérjék megtalálhatóak a zöld kénbaktériumokban, illetve a γ -proteobaktériumok csoportjába tartozó bíbor kénbaktériumokban. Működésükről kevés információ áll rendelkezésünkre, mivel eddig egyik tagja sem rendelkezik részletes jellemzéssel, azonban *Allochromatium vinosum*-ban szulfid függő kinon redukáló aktivitást igazoltak, feltételezhetően IV. típusú Sqr enzimének köszönhetően (Reinartz és mtsi 1998).

Az ide sorolható SQR fehérjék szekvenciái feltűnően karakteresek öt meghosszabbodott hurok által. A fehérjékben található „sapka hurok” hosszabb, mint az I. típusú SQR fehérjékben, azonban C terminálisuk hasonló méretű. (Marcia és mtsi 2009)

V. típusú SQR fehérjék

Az V. típusú SQR fehérjék megtalálhatók az Archebaktérium csoporthoz tartozó mikroorganizmusokban, többek között *Acidianus ambivalens*-ben, mely baktérium Sqr enzimét korábban jellemezték (Brito és mtsi 2009). Az V. típusú SQR fehérjéknek a szulfid függő respirációban van fiziológiás szerepe, affinitásuk a szulfidhoz mikromoláris nagyságrendű. Szerkezetük szignifikánsan különbözik az I. típusú SQR fehérjék szerkezetétől: hosszabb sapka hurokkal, és rövidebb C terminálissal rendelkeznek, illetve a FAD kötésében egy szerin vagy treonin is szerepet játszhat (Marcia és mtsi 2009).

VI. típusú SQR fehérjék

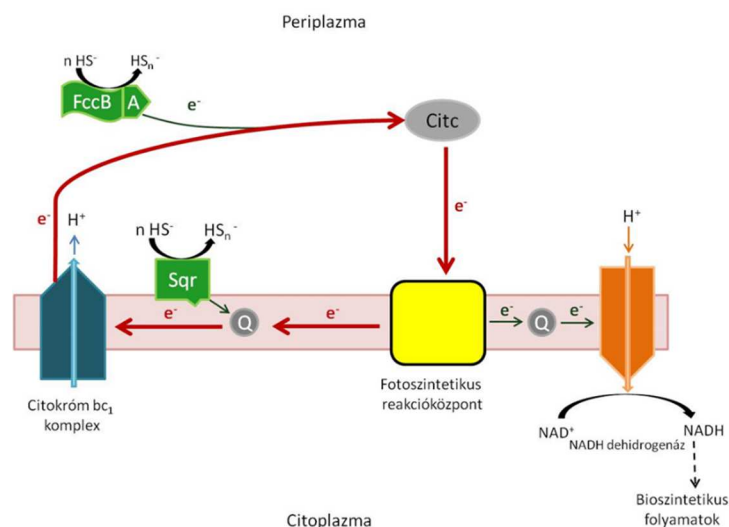
A többi családhoz képest a VI. típusú SQR fehérjékben nem találhatóak „sapka hurkok”, emellett különlegességük, hogy az *A. aeolicus* Sqr fehérjéjének 156. pozícióban lévő cisztein helyett metionin vagy valin található (Marcia és mtsi 2009).

1.4. Fototróf bíbor kénbaktériumok

A fototróf bíbor kénbaktériumokban található fotoszintézist végző apparátus leginkább a PSII fehérje komplexhez hasonlít, azonban vízbontásra nem képes. Ezen okból kifolyólag a fototróf bíbor kénbaktériumok a fotoszintézisükhöz szükséges elektronokat redukált szerves illetve szervetlen vegyületekből, legjellemzőbben redukált kénvegyületekből (szulfid, szulfit tioszulfát, elemi kén) nyerik.

A kénanyagcserének legfontosabb elemei a tioszulfát asszimilációért felelős Sox enzim rendszer, a szulfit szulfáttá történő oxidációját katalizáló szulfit dehidrogenáz enzim, az elemi kén oxidáló citoplazmatikus és membrán kötött komponensekből álló Dsr enzimrendszer. A szulfid oxidációért felelős enzimek a flavocitokróm c szulfid dehidrogenáz (FccAB) és szulfid kinon oxidoreduktáz (SQR) fehérjék.

A szulfid kinon oxidoreduktáz enzimek működésük során a szulfid oxidációjából származó elektronokat közvetlenül a membrán kinon raktárba juttatják, míg a flavocitokróm c periplazmatikus citokróm c fehérjéken keresztül juttat elektronokat a fotoszintetikus reakciócentrumba, így módon képesek a szulfid oxidációjából származó elektronok hasznosulni az energiakonzerváló folyamatokban (Dahl és mtsi, 2008). (3. ábra)



3. ábra – A fototróf bíbor kénbaktériumok szulfid oxidáló enzimei kénanyagcserében betöltött szerepének modellje. FccB (flavocitokróm c nagyalegység), FccA (flavocitokróm c kisalegység), Sqr (szulfid kinon oxidoreduktáz), Q (membrán kinon raktár), Citc (c típusú citokróm), nHS⁻ (szulfid) (Dahl és mtsi, 2008)

1.5. *Thiocapsa roseopersicina*

A *Thiocapsa roseopersicina* a *Chromatiaceae* családba tartozó, gram negatív fototróf bíbor kénbaktérium (Gogotov 1976, Pfenning és Trüpper 1991). Laboratóriumi körülmények között növekedési optimuma 25-28°C, kultúrája tápfolyadékban 4-5 nap alatt nő fel, míg szilárd táplemezen 14 nap alatt képez telepeket. Fototróf körülmények között a fotoszintézishez szükséges elektronokat redukált kénvegyületekből (pl. szulfid, tioszulfát) nyeri. Oxigén jelenlétében képes ecetsav és glükóz mellett heterotróf módon növekedni. Amennyiben a tápközeg nem tartalmaz nitrogén forrást (ammónium ion) képes a légköri nitrogén megkötésére nitrogenáz enzim segítségével, mely folyamat melléktermékeként hidrogén is keletkezik (Bogorov 1974).

1.6. Szulfid oxidáló enzimek *T. roseopersicina*-ban

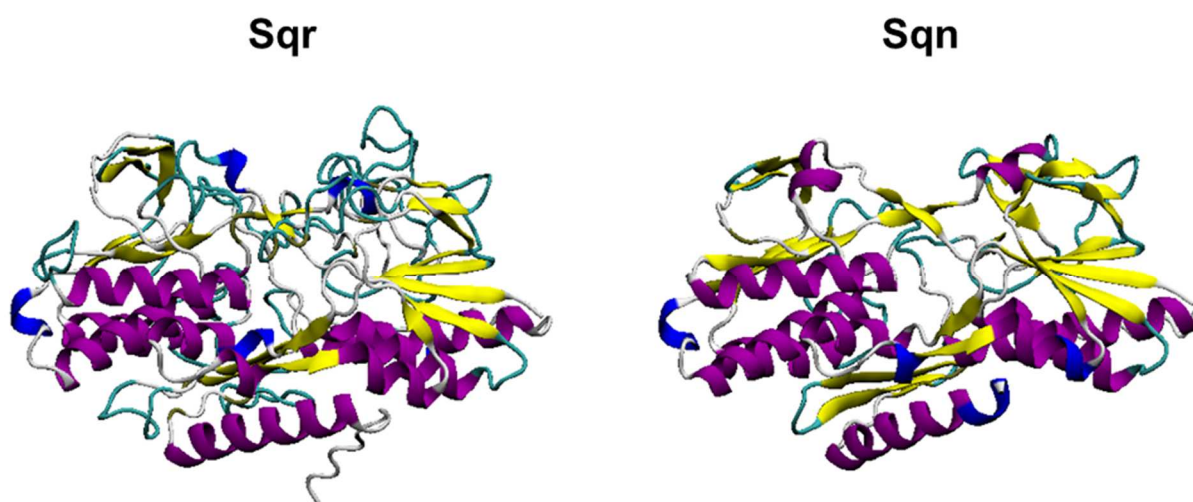
Kutatócsoportunk korábbi munkái során a *T. roseopersicina* genomjában 3 szulfid oxidáló enzimet kódoló gént azonosítottak, melyek a flavocitokróm c szulfid dehidrogenáz (*fccAB*), a szulfid kinon oxidoreduktáz 1 (*sqr*) illetve a szulfid kinon oxidoreduktáz 2 (*sqn*).

A *T. roseopersicina* Sqr és Sqn fehérjéi szekvenciájának többszörös illesztéses módszerrel történő összehasonlítása a különböző SQR alcsaládokba tartozó fehérjék szekvenciájával megmutatta, hogy az Sqr fehérje a IV. csoportba, míg az Sqn a VI. csoportba sorolható SQR típusú enzim (1. számú melléklet). Az ezekre a csoportokra jellemző konzervált aminosavak és szekvencia mintázatok egyértelműen azonosíthatók a *T. roseopersicina* SQR fehérjéiben. A VI. csoportba tartozó fehérjék különleges jellemzője, hogy jellegzetes szekvenciái több ponton is eltérnek a többi csoportban általánosan előforduló mintázatoktól. Így például az

A. aeolicus Cys156 csoportjának homológja kizárólag a VI. típusú SQR fehérjékből hiányzik. Ellenben ezen csoport minden képviselőiben azonosítható egy csak rájuk jellemző konzervált cisztein (*T. roseopersicina*-ban: Cys272).

Kutatócsoportunkban korábbi *in silico* vizsgálatok során homológia modellezés módszerrel készültek szerkezeti modellek a *T. roseopersicina*-ban található Sqr és Sqn fehérjékre (4. ábra). A kísérletesen meghatározott három SQR fehérje térszerkezet közül az *Acidithiobacillus ferrooxidans* I. típusú Sqr enzimének térszerkezete bizonyult a legjobb mintának a *T. roseopersicina* Sqr és Sqn fehérjéje esetében is a térszerkezetük modellezésére. Az elkészített modellek alapján elmondható, hogy az Sqn első konzervált ciszteinje (C121) jóval távolabb esik a FAD kofaktor C8M metil-csoportjától, mint *A. ferrooxidans* Sqr első konzervált ciszteinje (C128). Az *A. ambivalens* Sqr enzimének esetében a második két konzervált cisztein helyén *T. roseopersicina* Sqn enzimében 156. pozícióban egy metionin, 333. pozícióban pedig egy cisztein található, melyek a FAD közelében lokalizálódnak.

Ezen felül a *T. roseopersicina* Sqn enzimét kódoló gén szekvenciájában azonosítottak egy ciszteint (Cys272) melynek homológjai az eddig ismert összes VI. típusú SQR fehérjében megtalálhatók, azonban nincsenek jelen a többi alcsaládban tartozó SQR fehérjékben (Beke és Tóth személyes közlése 2014). Ezek alapján ennek a ciszteinnek az enzimekben való jelenléte kizárólag a VI. típusú SQR fehérjékre jellemző tulajdonság, amelynek funkciója még nem ismert. Habár több élőlényben azonosítottak VI. típusú SQR enzimet, ezen fehérjék biokémiai, strukturális, és funkcionális jellemzése eddig még nem történt meg.



4. ábra – A *Thiocapsa roseopersicina* Sqr és Sqn fehérjéinek homológia modelljei

2. Célkitűzések

Tudományos diákköri kutatásom célja egy eddig még nem jellemzett VI. típusú SQR fehérje szerkezeti és működési vizsgálata.

Kutató csoportunk korábbi munkái során ki lett dolgozva több módszer az Sqn fehérje tisztítására, azonban ezekkel a módszerekkel nem lehetett a biokémiai jellemzéshez elegendő mennyiségű és megfelelő minőségű tisztított fehérjét ismételhetően előállítani.

A fehérje jellemzéséhez elengedhetetlen fontosságú, hogy legyen egy megbízható, hatékony, reprodukálható, lépték növelhető módszer a fehérje tisztítására, amely nagy mennyiségű, nagy tisztaságú, jó minőségű fehérje kitisztítását teszi lehetővé. Így célul tűztem ki:

- Az Sqn fehérje tisztítási módszerének továbbfejlesztését a fehérje membránból való felszabadításának és a tisztítási folyamata kritikus lépéseinek optimalizációjával.
- A tisztított fehérje kofaktor tartalmának igazolását és vizsgálatát.
- A VI. típusú SQR fehérje biokémiai jellemzését.
- A tisztított fehérje negyedleges szerkezetének, valamint a negyedleges szerkezet és az aktivitás összefüggéseinek vizsgálatát.
- Az Sqn enzim aktív centrumának felépítésében és a katalitikus folyamatokban résztvevő aminosavak azonosítását.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Felhasznált baktérium törzsek

A felhasznált törzsek listáját az 2. számú melléklet tartalmazza.

3.2. Felhasznált primerek

A felhasznált primerek listáját a 3. számú melléklet tartalmazza.

3.3. Mikroorganizmusok tenyésztése

3.3.1. *E. coli* növesztési körülmények

Az *E. coli* törzseket LB tápoldatban, Erlenmeyer lombikban, a kísérletnek megfelelő hőmérsékleten, rázatott tenyészetben vagy LB agar lemezen, termosztátban növesztettem (Ausubel és mtsai., 1996). A tápoldatoknál alkalmazott ampicillin koncentráció 100 µg/ml, a kanamicin koncentráció 25 µg/ml, volt.

LB (Luria-Bertani) tápoldat (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 + Mg²⁺) (1 liter) összetétele: 0,5 g NaCl, 20 g tripton, 5 g élesztő kivonat, 10 mM MgSO₄.

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, mikroanaerob környezetben, folyamatos megvilágítás mellett 4-5 napig növesztettem.

PC tápoldat (1 liter): 20 g NaCl, 1 g KH₂PO₄, 1 g MgCl₂, 1 g KCl, 1 g NH₄Cl, 2 g NaHCO₃, 2 g Na₂S₂O₃, 20 µl B12 vitamin (1000 µg /ml), 1 ml Fe-EDTA, 1 ml mikroelem oldat.

Mikroelem oldat: 2975 mg Na₂ - EDTA, 300 mg H₃BO₄, 200 mg CaCl₂.6 H₂O, 100 mg ZnSO₄.7 H₂O, 30 mg MnCl₂.4 H₂O, 30 mg Na₂MoO₄.2 H₂O, 20 mg NiCl₂.6 H₂O, 10 mg CuCl₂.2 H₂O, 1000 ml vízben (Pfennig és Trupper, 1992). A tápoldatoknál alkalmazott antibiotikum (gentamicin, streptomycin, kanamicin) koncentráció 25 µg/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 Plasmid Miniprep Kit-et (Sigma) használtam. A tápoldatban felnőtt sejteket 4,5 ml-enként külön mikrocentrifuga csövekben, centrifugálással (1 perc, 7000 rpm) gyűjtöttem össze, majd 200 µl, hűtött (4°C),

RNáz tartalmú szuszpendáló oldatban vettem fel. A sejtekre 200 µl lízis puffert mértem, majd kézzel megforgattam a mikrocentrifugacsöveket. A feltárt sejtekhez ezután 350 µl neutralizáló oldatot adtam, a csövek forgatása után, a centrifugálással (10 perc, 13000 rpm) keletkezett plazmidot tartalmazó felülúszóval dolgoztam tovább. A plazmid tisztító oszlopot 500 µl oszlop előkészítő oldattal kezeltem, majd az oldatot centrifugálással távolítottam el róla (1 perc, 13000 rpm). Az előkészített oszlopra 750 µl felülúszót mértem, majd centrifugálással felkötöttem a felülúszóban lévő plazmid DNS-t az oszlopra (1 perc, 13000 rpm). Két lépésben, 2x750 µl mosó pufferrel, centrifugálással (1 perc, 13000 rpm) távolítottam el a nem specifikusan kötődő anyagokat. A mosó puffer eltávolítása érdekében az oszlopot még egyszer centrifugáltam. Az oszlopra kötődő plazmid DNS-t 2x20 µl ultratiszta, ioncserélt vízzel, centrifugálással (1 perc, 13000 rpm) eluáltam.

3.4.2. DNS szerkezet módosítások

Irányított mutagenézis

A mutagenézist pBluescript SK+ vektorba épített Sqn fehérjét kódoló DNS fragmenten végeztem. Az 50 µl végtérfogatú reakcióelegy a következő komponenseket tartalmazta: 20 ng templát DNS, 200 µM dNTP-t, 10× Phusion HF puffert, valamint a megfelelő mutációt hordozó primer párok tagjaiból 125–125 ng-ot. Az *in vitro* szintézist 2,5 U Phusion DNS polimerázzal végeztem, a következő program alapján: 30 mp 95°C-os kezdeti denaturációt követően a 30 másodperc 95°C, 1 perc 55°C, 6 perc 72°C lépéseket 16-szor ismételtettem meg. Az *in vitro* szintézis termékét a reakcióelegyekhez adott 10 U/µl DpnI enzimmal emésztettem 1 órán át 37°C-on, ezt követően *E. coli* Novablue törzsbe transzformáltam.

Emésztés restrikciós endonukleázokkal

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

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.

Ligálás

A DNS fragmentumok ligálása T4 DNS ligázzal (Fermentas) történt. A kívánt DNS szakaszt háromszoros feleslegben adtam a meghasított vektorhoz. A reakcióhoz 5x-ös Rapid Ligáz Puffert (Fermentas) használtam. 30 percig 22°C-on történt az inkubáció.

3.4.3. Agaróz gélelektroforézis

A tisztított DNS mintákat, PCR reakciók termékeit 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 gélelektroforézist követően a megfelelő DNS fragmenteket tartalmazó gél darabokat pengével vágtam ki, majd tömege hámszorosának megfelelő térfogatú QG puffert adtam hozzá (1 adag gél: 100 mg = 100 µl). Az elegyet 50°C-on inkubáltam, 2-3 percenként kevertettem, a gél teljes feloldódása után egy gélnyi mennyiségű izopropanolt keverttem hozzá. Az oszlop előkészítése után a feloldódott gél darabot tartalmazó oldatot az oszlopra mértem, majd centrifugáltam (1 perc, 13000 rpm). Az átfolyótól megszabadultam, 750 µl PE pufferrel mostam az oszlopot, majd centrifugáltam (1 perc, 13000 rpm). A mosó puffer eltávolítása érdekében az oszlopot még egyszer centrifugáltam (1 perc, 13000 rpm). A DNS-t 2x15 µl steril, ioncserélt vízzel, centrifugálással (1 perc, 13000 rpm) eluáltam.

3.5 Baktériumok transzformálása

3.5.1 *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 hősoakk, 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 szétterítettem ki.

3.5.2 *Thiocapsa roseopersicina* transzformálása

A *T. roseopersicina* transzformációját konjugáción keresztül valósítottam meg. A donor (S17 lambda-pir *E. coli*) és a recipiens (*T. roseopersicina*) sejteket 37 illetve 28°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 PC oldatban felfuszpendáltam. Centrifugálás után az 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 cseppentettem ki (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). 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 oxigén mentesítettem. Az inkubáció 28°C-on, fényen történt és 14 napig tartott.

3.6. Fehérje termelés és tisztítás

3.6.1. Sejtfeltárás

A fehérje termelő *Thiocapsa roseopersicina* törzseket a leoltást követő 6. napon dolgoztam fel. A sejteket centrifugálással (7.000 rpm 10 perc 4°C) elválasztottam a tápoldattól. A sejtfeltárás kétféleképpen valósult meg. Egyik esetben a tápoldattól elválasztott sejteket TBS pufferben (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl) szuszpendáltam fel (500 ml kultúra sejteit 6 ml pufferben). A másik esetben a sejtekből szferoplasztokat állítottam elő, azáltal hogy a sejteket 10 ml periplazmatizáló oldatban (25% szukróz 0,1% lizozim) szuszpendáltam fel. A szuszpenziót 30 percig 30°C-on inkubáltam, majd periplazma oldattal megegyező mennyiségű steril, hűtött vizet adtam hozzá. A vízzel elegyített sejtsuszpenziót 10 percig jégen inkubáltam. Az inkubációt követően centrifugálással (9.000. rpm 15 perc 4°C) elválasztottam a szferoplasztokat a felülúszótól (periplazma frakció). Ezután 500 ml kultúrának megfelelő szferoplasztot 6 ml TBS pufferben felszuszpendáltam. A sejtek és szferoplasztok 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 mintákat jégen tartottam. Ezt követően a sejtfalmaradványokat, a feltáratlan sejteket, továbbá a kénglobulusokat centrifugálással (15 perc, 15.000 rpm, 4°C) távolítottam el, majd az így keletkezett felülúszóval (sejt kivonat) dolgoztam tovább.

3.6.2. Membrán frakció előállítása

A sejtek és szferoplasztok feltárását követő centrifugálás során kapott felülúszót ultracentrifugálásnak (UC) (Sorvall WX Ultra Series 90 típusú ultracentrifuga, T-1270 típusú rotor, 4°C, 90 perc, 38000 rpm) vetettem alá. Az így kapott felülúszó a szolubilis sejtfrakciónak felel meg (szferoplasztok esetén citoplazma frakciónak), a csapadék pedig a membrán

frakciónak, melyet 3 ml TBS pufferben felfuszpendáltam és a felhasználásig -20°C-on tároltam.

3.6.3. A fehérjék felszabadítása a membránból

A fehérjék membránból való felszabadítását nátrium bromiddal történő kezeléssel értem el. A kezelést 8 ml végtérfogatban végeztem, kísérlettől függően különböző mennyiségű membrán frakciót, puffert és nátrium bromid oldatot tartalmazott az elegy. A kezelés folyamatos forgatás mellett, 25°C-on 1 órán keresztül történt. Ezt követően az ultracentrifugálásnak vetettem alá (53.000 rpm 4°C) és az így keletkezett felülúszót használtam a fehérje tisztítási lépésben.

3.6.4. Fehérje tisztítás affinitás kromatográfiával

Az előbbieken leírt felülúszót 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 felszabadított fehérjéket tartalmazó felülúszót 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 (hidroxi-azofenil-benzoidsav) kezeltem. Az újra felhasználható oszlopot 4°C-on tároltam.

3.7 Tisztított fehérjék vizsgálata

3.7.2 Fehérje abszorpciós spektrum meghatározás

Az affinitás kromatográfiával tisztított fehérje abszorpciós spektrumának meghatározásához Nicolet Evolution 300 spektrofotométert használtam. A fehérjét tartalmazó oldat fényelnyelését 1 cm fényúttal rendelkező kvarcküvetében, 250-850 nm hullámhosszúságú tartományban mértem.

3.7.3 Szulfid függő kinon redukáló aktivitás mérés

A tisztított enzim szulfid-függő kinon redukáló aktivitásának méréséhez Nicolet Evolution 300 típusú spektrofotométert használtam. Az 1 ml végtérfogatú reakcióelegyekben történő fényelnyelés változást 1 cm fényúttal rendelkező, légmentesen zárható kvarcküvetékben mértem. A reakcióelegy kísérletenként különböző mennyiségű tisztított fehérjét, szubsztrátot, valamint 0,05% Tween 20 detergenst tartalmazott, melyet közvetlenül a DMSO-ban feloldott kinon vegyületekhez kevertem. A reakcióelegy pH-ja kísérlettől függően változott

pH= 6,0 – 9,5 tartományban. A reakcióelegyet nitrogén gázzal történő átfúvatással 5 percen keresztül anaerobizáltam, majd közvetlenül a mérés előtt, anaerob körülmények között előállított nátrium szulfid oldat hozzáadásával indítottam a reakciókat. A minták fényelnyelésének csökkenését az oxidált kinon vegyületekre jellemző fényelnyelés maximumán, 275 nm-en vizsgáltam. Mivel a szulfid függő kinon redukció bizonyos kinon vegyületek esetében abiotikus úton is végbe mehet, ezért az egyes mérések során 3 párhuzamos enzimet tartalmazó, illetve enzim mentes mintákkal dolgoztam. A kiértékelés során pedig levontam az enzim mentes háttérét az enzimet tartalmazó minták értékeiből.

3.8. Poliakrilamid gélelektroforézis technikák

3.8.1. 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 TGS (Tris-glicin-SDS) 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, SDS tartalmú felvivő pufferrel inkubáltam, majd a mintákat a gél zsebeibe mértem. A gélek futtatása TGS (25 mM Tris-Base 192 mM glicin-1% SDS) pufferben, kezdetben 60 V feszültséggel, majd a fehérjék szeparáló gélbe érkezése után 120 V 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 Blue Silver festékkel (1 L: 250 ml H₂O, 117,64 ml 85 % foszforsav, 100 g ammónium szulfát, 1,2 g Coomassie blue G-250, 200 ml etanol) éjszakán át festettem. A felesleges festéket másnap 1%-os ecetsavas mosással távolítottam el.

3.8.2. Natív poliakrilamid gélelektroforézis

A tisztított fehérjék negyedleges szerkezetének vizsgálatát denaturáló ágensektől mentes natív gélen végeztem. Az 1,5 mm vastagságú 5-15% grádiens géleket TG (25 mM Tris-Base,

192 mM glicin) puffer rendszerben futattam meg 100 V feszültséggel 4 órán keresztül. A gélt egy kétcsatornás grádiens gélöntő (BioRAD) segítségével készítettem el. A grádiens gélöntő egyik csatornájába 15%-os, a másik csatornába pedig 5%-os gélt készítettem. A grádiens egyenletes kialakulása érdekében az első csatornában lévő elegyet mágnes keverővel kevertettem, amíg a gél elkészült. A gél összetétele:

5% gél összetétele: 3,15 ml H₂O, 0,920 ml 30 % akrilamid - biszakrilamid (29:1) keverék, 1,4 ml 1,5 M Tris-HCl puffer (pH = 8,8), 0,05 ml 10 % ammónium perszulfát, 0,003 ml TEMED.

15% gél összetétele: 1g szukróz, 0,85 ml H₂O, 2,75 ml 30 % akrilamid - biszakrilamid (29:1) keverék, 1,4 ml 1,5 M Tris-HCl puffer (pH = 8,8), 0,05 ml 10 % ammónium perszulfát, 0,003 ml TEMED.

A fehérjemintákat 0,02% Comassie G-250 tartalmú natív felvivő pufferrel elegyítettem, majd a mintákat a gél zsebeibe mértem. A futtatás 4 órán keresztül 100 V feszültséggel történt.

3.8.3. Western hibridizáció

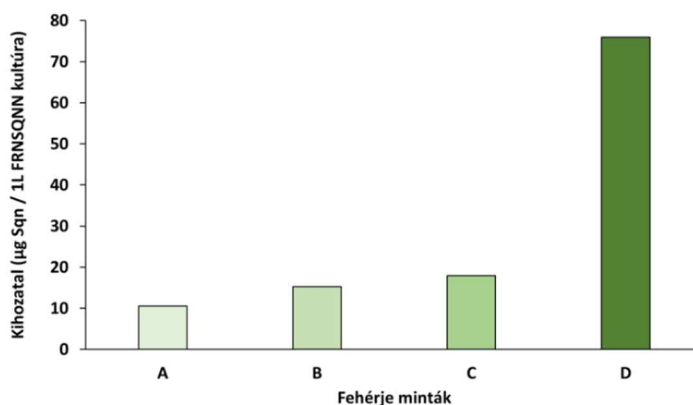
A denaturáló illetve a natív poliakrilamid gélelektroforézis után a gélből a fehérjéket nitrocellulóz membránra (AmershamTM HybondTM-ECL) blottoltam. A blottolást Trans-Blot[®] SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (BIO-RAD) készülék segítségével (45 perc, 25 mV; 1 l transzfer puffer: 48 mM Tris, 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) inkubáltam, 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 luminol 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 CCD kamerával detektáltam. (VersaDoc 4000MP (BIO-RAD)).

4. Eredmények

4.1. Hatékony, reprodukálható, léptéknövelhető módszer kidolgozása a *T. roseopersicina* Sqn fehérje tisztítására.

A kutatócsoportunk korábbi munkái során kiderült, hogy az Sqn fehérje felszabadítható a membránból 1,5 M nátrium bromid segítségével, azonban a módszer nem volt reprodukálható és kevés fehérjét lehetett vele kitisztítani, mivel a membrán kezelést követő ultracentrifugálás után a felülúszó fotoszintetikus pigmentekkel szennyezett volt. Munkám során két ponton terveztem változtatni és ezáltal növelni a módszer hatékonyságát. Az egyik a membránból felszabadított Sqn fehérjék mennyiségének a növelése, a másik pedig a felszabadított fehérjét tartalmazó felülúszó fotoszintetikus pigmentektől mentesítése.

A Gram negatív *T. roseopersicina* sejteket két membrán réteg határolja. Ha a sejtekből szferoplasztokat készítünk, majd ezeket a szferoplasztokat feltárjuk, akkor a sejt kivonat ultracentrifugálással történő szétválasztása után a csapadékot már egy meglazított állapotú külső membrán és szferoplaszt membrán elegye alkotja, szemben intakt sejtekből kinyert membrán frakcióból, így előfordulhat hogy a külső membrántól meglazított belső membránról a nátrium bromid hatékonyabban képes leválasztani az Sqn fehérjét. Ha membrán frakciót (5. ábra „A”) és szferoplaszt membrán frakciót (5. ábra „B”) kezeltem 1,5 M nátrium bromiddal látható, hogy a szferoplaszt membrán frakcióból több fehérjét sikerült felszabadítani.



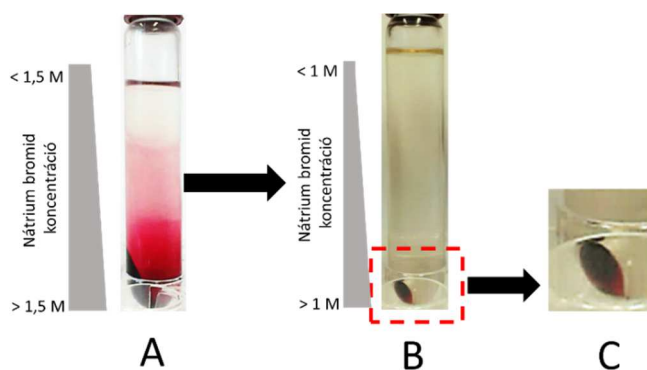
5. ábra – Sqn fehérje tisztítások 1 liter FRNSQNN kultúrára vonatkoztatott kihozatala. A és B minták: sejt- és szferoplaszt membrán NaBr kezelését követően tisztított Sqn fehérje mennyisége. C és D minták: sejt- és szferoplaszt membrán EDTA jelenlétében történő NaBr kezelését követően tisztított Sqn fehérje mennyisége.

A biológiai membránokat kétértékű ionok stabilizálják. Ha ezt a stabilizáló erőt csökkentjük azáltal, hogy kelátoló ágenseket alkalmazunk a membrán kezelés során, a membrán destabilizálódik, így a nátrium bromid könnyebben hozzáférhet a fehérjékhez. Ezért a 1,5 M nátrium bromiddal történő kezelést mellett egy 10 mM EDTA általi előkezelést végeztem membrán frakción, illetve szferoplaszt membrán frakción. Az így kezelt membrán frakció (5.

ábra „C”) és a szferoplaszt membrán frakció (5. ábra „D”) ultracentrifugálás utáni felülúszójából fehérjét tisztítottam affinitás kromatográfiával.

Összességében elmondható, hogy a külső membrántól meglazított szferoplaszt membránról lehetett a legtöbb fehérjét oldatba vinni a kezelés során alkalmazott 1,5 M NaBr és 10 mM EDTA által, ezért ezzel a módszerrel szabadítottam fel az Sqn fehérjéket a membránból további munkák során.

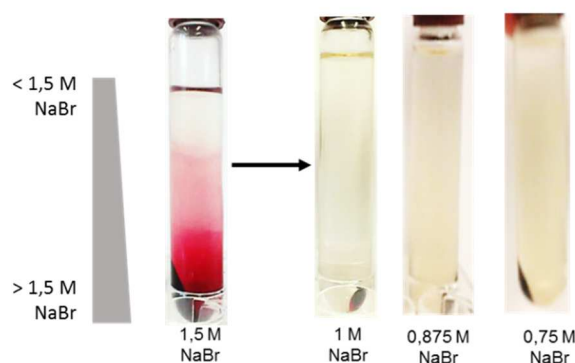
A membránról oldatba vitt fehérjék mennyiségének növelése mellett a másik fő cél a membrán kezelést követő ultracentrifugálás után kapott felülúszó fotoszintetikus pigmentektől mentessé tétele. Egy ilyen magas só koncentrációjú kezelés során a 1,5 M nátrium bromid képes a membránról leválasztott fehérjéket oldatban tartani, azonban a magas fordulatszámú ultracentrifugálás során kialakul egy nátrium bromid sűrűség grádiens. Így az ultracentrifugálás során nagyobb sűrűségű membrán szigetek képesek leülepedni a csapadékba mivel sűrűségük meghaladja a nátrium bromid grádiens legsűrűbb pontját, szemben a kisebb méretű membrán szigetekkel, melyek megrekednek a grádiensben (6. ábra „A”). Az így keletkezett felülúszónak csupán töredékét lehet felhasználni fehérje tisztításra, ugyanis a membrán szigetek nem csak affinitás peptiddel ellátott Sqn fehérjéket hordozhatnak, hanem fotoszintetikus reakciócentrumokat is. A membrán szigeteken található jelölt Sqn fehérjék által a fotoszintetikus reakció centrumok együtt tisztulnak az oldatba vitt Sqn fehérjékkel. Ennek eredménye, hogy a tisztítás során kapott fehérje minta abszorbancia spektrumában az SQR fehérjékre jellemző fényelnyelési csúcsokat elfedik a fotoszintetikus pigmentekre jellemző elnyelési csúcsok.



6. ábra – „A” - 1,5 M NaBr jelenlétében az ultracentrifugálás alatt kialakult sűrűség grádiens, „B” – 1,5 M NaBr tartalmú felülúszó 1 M-ra történő hígítását követő ultracentrifugálás utáni pigment mentes felülúszó, „C” a 1,5 M NaBr által kialakított sűrűség grádiensben rekedt membrán szigetek, melyek a hígítást követő ultracentrifugálás során leülepedtek

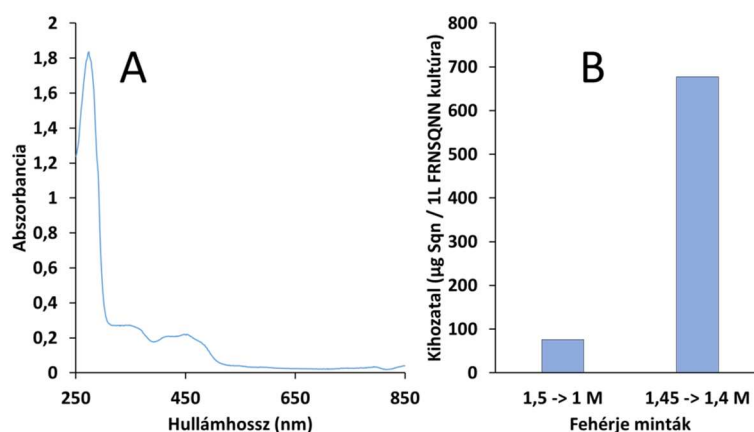
A sűrűség grádiens csökkentésével már elérhető, hogy a kisebb membránszigetek sűrűsége nagyobb legyen, mint a NaBr sűrűség grádiens legnagyobb sűrűségű pontja, ezáltal a

membránszigetek képesek leülni a csapadékba (6. ábra „B” és „C”) és pigmentektől mentes felülúszót kapunk. Megvizsgáltam, hogy milyen nátrium bromid koncentráció szükséges ahhoz, hogy a membrán szigetek maradéktalanul leülepedjenek a csapadékba az ultracentrifugálás során (7. ábra). A kísérlet alapján elmondható, hogy elég volt 1,5 M-ról 1 M-ra csökkenteni a nátrium bromid koncentrációját ahhoz, hogy pigmentektől mentes felülúszót kapjunk az ultracentrifugálás után.



7. ábra – A membrán kezelést követő ultracentrifugálás utáni pigmentes felülúszó nátrium bromid koncentrációjának hígítása 1, 0,875, illetve 0,75 M-ra, majd az ezt követő ultracentrifugálás utáni pigmentektől mentes felülúszók.

Azonban a nátrium bromid koncentráció 1,5 M-ról 1 M-ra történő hígítása miatt a fehérjéket oldatban tartó magas só koncentráció megszűnik, ezért az oldatba vitt fehérjék visszajuthatnak a membránba, ebből kifolyólag nagyon kevés fehérjét lehet az így kapott felülúszóból affinitás kromatográfiával tisztítani. (8. ábra „B”)



8. ábra – „A”- A 10 mM EDTA jelenlétében 1,45 M nátrium bromiddal szolubilizált, affinitás kromatográfiával tisztított fehérje abszorbancia spektruma (az abszorbancia spektrum felvételéhez az elúciót négyszeresen hígítottam) „B” a kétféle módszer kihozatala

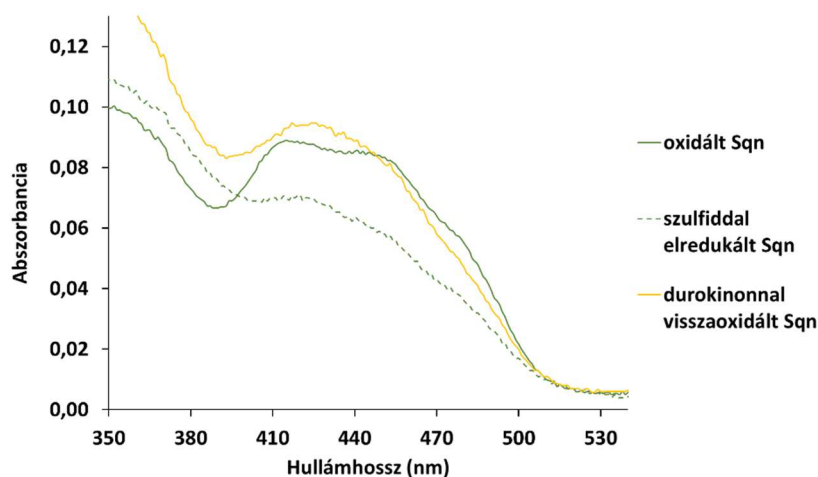
A kísérletekből jól látszik, hogy a magas só koncentrációval (1,5 M NaBr) ugyan oldatban lehet tartani a fehérjéket, azonban a sűrűség grádiens kialakulása miatt a grádiensben rekedt membrán szigetek miatt a felülúszónak csupán töredékét lehet felhasználni. Azonban ha

csökkentjük a NaBr koncentrációt, a felülúszó pigment mentes lesz, ellenben jóval kevesebb fehérjét is tartalmaz. Annak érdekében, hogy a membrán kezelést követően egy olyan felülúszót kapjak, mely pigmentektől mentes, azonban a felülúszóból nagy mennyiségű Sqn fehérjét lehessen tisztítani affinitás kromatográfiával, minimálisan csökkentettem a kezelés során alkalmazott NaBr koncentrációt (1,5 M-ről 1,45 M-ra) valamint az ultracentrifugálás utáni hígítás mértékét (1,45 M-ről hígítottam 1,4 M-ra), majd az így kapott felülúszóból affinitás kromatográfiával fehérjét tisztítottam. (8. ábra „A”)

Összegezve 10 mM EDTA és 1,45 M NaBr által kezelt szferoplaszt membrán frakciók ultracentrifugálás utáni felülúszójának nátrium bromid koncentrációját 1,4 M-ra hígítva, majd újból magas fordulatszámú centrifugálásnak alávetve olyan pigmentektől mentes felülúszót kapunk, melyből nagy mennyiségű és tisztaságú Sqn fehérjét lehet tisztítani affinitás kromatográfiával. Ezzel a módszerrel biokémiai valamint spektroszkópai vizsgálatokra alkalmas fehérjét lehet előállítani.

4.2.A vad típusú fehérje redox aktív kofaktor tartalmának igazolása

Mivel az ismert SQR típusú fehérjék FAD kofaktor tartalmú és szulfid függő kinon redukáló aktivitású enzimek célul tűztem ki, hogy általam tisztított VI. típusú SQR fehérje (Sqn) kofaktor tartalmát és redox működését megvizsgáljam.



9. ábra – Tisztított Sqn oxidált és redukált abszorbancia spektruma

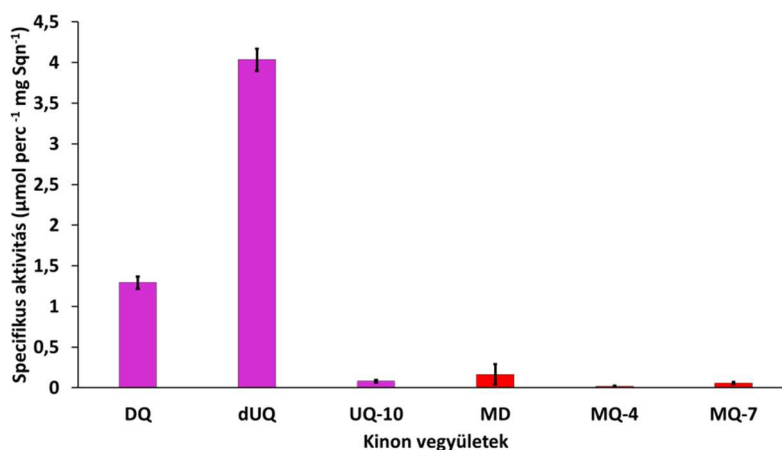
Az tisztított Sqn fehérje minta (10 μ M) abszorpciós spektrumában azonosítottam az oxidált állapotú, fehérjéhez kötött FAD kofaktorra jellemző 450 illetve 480 nm-es elnyelési csúcsokat. 500 μ M szulfid hozzáadása után ezek a csúcsok kioltódnak, mely a fehérje redukáltságára utal. Az Sqn visszaoxidálása 100 μ M durokinon alkalmazásával elérhető volt. Tehát a tisztított enzim redox aktív FAD kofaktort tartalmaz, valamint szulfid függő durokinon redukáló

aktivitással rendelkezik (9. ábra), ezért következő lépésként megvizsgáltam a fehérje mennyire széles spektrumú kinon szubsztrát specifitással rendelkezik.

4.3. Az Sqn fehérje biokémiai jellemzése

4.3.1. Az Sqn kinon szubsztrát specifitási spektrumának vizsgálata

Az irodalom alapján elmondható, hogy a különböző SQR fehérjék többféle kinon molekulát képesek elfogadni elektron akzeptornak. Ahhoz, hogy megtaláljam a legideálisabb szubsztrátokat, meg kellett vizsgálnom a fehérje kinon preferenciáját. A tisztított enzim kinon szubsztrát specifitását 50 μM kinon, és 200 μM szulfid, valamint a nem vízdékony kinon vegyületek esetén 0,05% Tween 20 detergens koncentráció mellett vizsgáltam. A DMSO-ban feloldott kinon vegyületekhez azért adtam Tween 20 detergenst, hogy stabilan oldható állapotúvá tegyem a hidrofób vegyületeket enzimreakció elegyekben. A 0,05% detergens koncentráció képes oldatba vinni a hidrofób kinon vegyületeket, azonban a fehérje aktivitását nem befolyásolja.



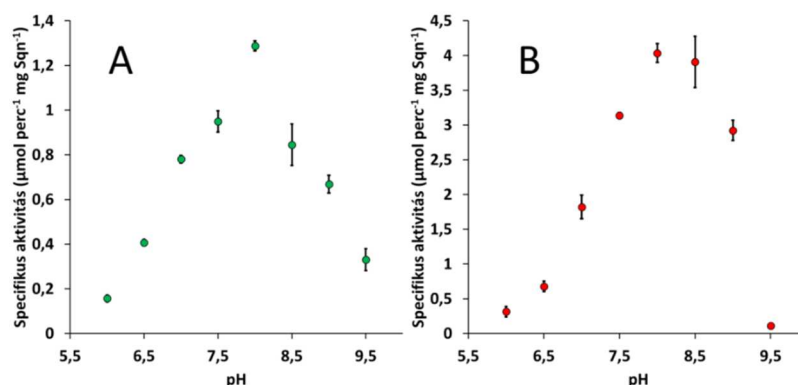
10. ábra – Az Sqn kinon preferenciája – DQ – durokinon, dUQ – decilubikinon, UQ-10 – ubikinon-10, MD – menadion, MQ-4 – menakinon – 4, MQ-7 – menakinon-7

Az általam megvizsgált kinonok egy gyűrűs, azaz ubikinon típusú kinonok (durokinon, decilubikinon, ubikinon-10) illetve két gyűrűs menakinon típusú kinonok (menadion, menakinon-4, menakinon-7) voltak. A kísérletek alapján azt tapasztaltam, hogy az Sqn enzim a durokinont illetve a decilubikinont fogadja el elektron akzeptornak, így ezzel a két kinon vegyülettel dolgoztam tovább. (10. ábra)

4.3.2. A pH hatása az Sqn szulfid függő kinon redukáló aktivitására

A tisztított fehérje teljes körű biokémiai jellemzése érdekében megvizsgáltam a fehérje aktivitásának pH függését (11. ábra), mivel az optimális pH tartományában érdemes meghatározni az enzimre jellemző kinetikai paramétereket (K_m értékek, K_{cat} értékek, aktivációs energia). A pH függés vizsgálatát durokinon illetve decilubikinon szubsztrátokkal

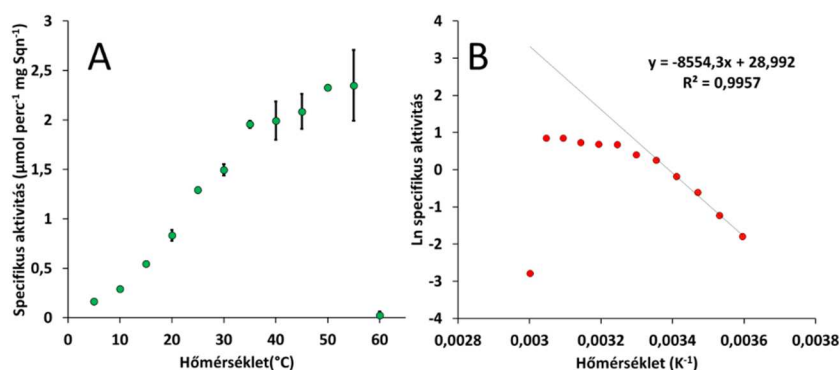
végeztem el, minden reakcióban 50 μM kinon és 200 μM szulfid szubsztrát koncentrációkat alkalmazva. Mindkét kinon szubsztrát esetén az optimum pH= 8,0, így a további vizsgálatok során ezen pH-n dolgoztam tovább.



11. ábra – Az Sqn szulfid függő kinon redukáló aktivitásának pH függése durokinon („A”) és decilubikon („B”) elektron akceptor szubsztrátok mellett.

4.3.3. A hőmérséklet hatása az Sqn szulfid függő kinon redukáló aktivitására

Az enzim aktivitásának a hőmérséklettől való függésének vizsgálata (12. ábra „A”) során 50 μM durokinon és 200 μM szulfid szubsztrát koncentrációkat alkalmazva mértem az szulfid függő kinon redukáló aktivitás sebességének a változását 5-60°C tartományban.



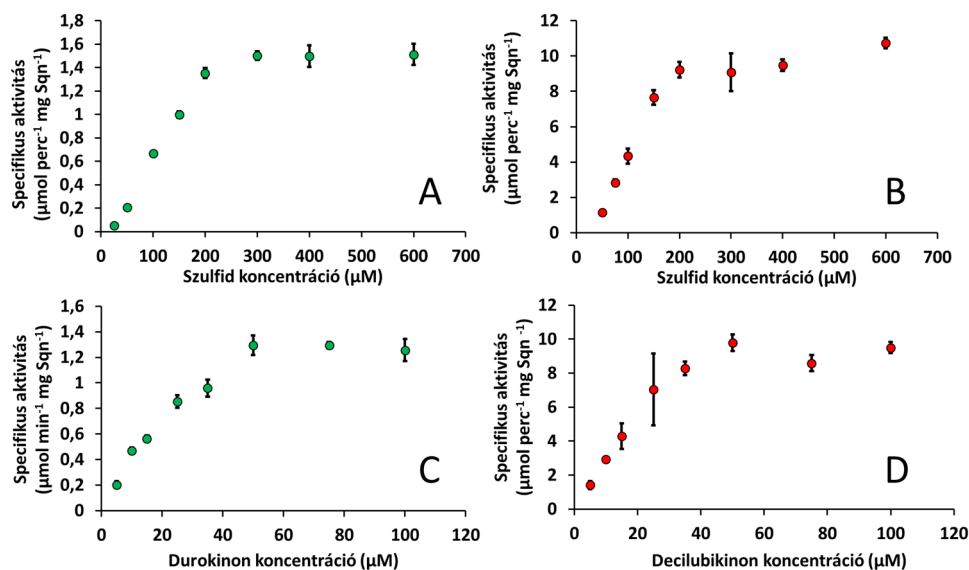
12. ábra – (A) Az Sqn hőmérséklet függése, (B) az Sqn enzim aktivációs energiájának meghatározása

A hőmérséklet 55°C-ig növelésével az Sqn által katalizált kinon redukció sebessége növekszik, 60°C-on azonban már nem mértem durokinon redukciót.

Az alacsony hőmérsékleti tartományban mért reakciósebességek logaritmizált értékeire nagy pontossággal egyenes illeszthető, mely azt jelenti, hogy ebben a tartományban a reakciósebesség változás a hőmérséklet emelkedésével exponenciális volt, ezért erre a szakaszra igaz az Arrhenius-egyenlet. A logaritmizált reakciósebességek, a kelvinben kifejezett hőmérsékletek reciprokának függvényében ábrázolva, a lineáris szakaszra illesztett egyenes (12. ábra „B”) meredekségével és az egyetemes gázállandó segítségével ki lehet számolni az aktivációs energiát, mely az Sqn fehérje esetében: 71,091 $\text{kJ K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$.

4.3.4. Az Sqn kinetikai paramétereinek meghatározása

Az Sqn enzimet más alcsaládokba tartozó, már jellemzett SQR fehérjékkel való összehasonlítása érdekében megvizsgáltam az Sqn aktivitás szubsztrát függését, amely mérések alapján megállapítottam a kinetikai paramétereket. Meghatároztam a szulfid függő kinon redukáló aktivitás kinon koncentrációtól való függését durokinon illetve decilubikinson szubsztrátokkal, továbbá a szulfid függő kinon redukációs aktivitás szulfid koncentrációtól való függését durokinon és decilubikinson szubsztrátok jelenlétében (13. ábra).



13. ábra – Az Sqn fehérje szubsztrát függésének vizsgálata: szulfid koncentráció függés durokinon (A) illetve decilubikinson (B) elektron akceptorok jelenlétében, valamint durokinon (C) és decilubikinson (D) koncentráció függés.

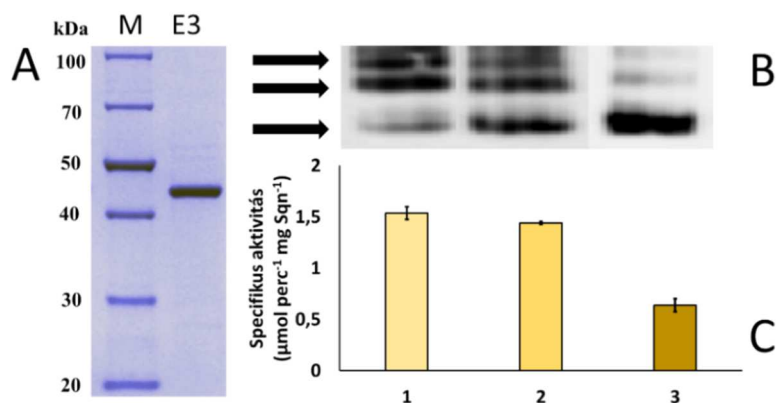
A kinetikai paraméterek, köztük a K_m értékek meghatározását a mért enzimaktivitás értékekre történő nem lineáris regressziós illesztéssel valósítottam meg (1. táblázat).

Elektron akceptor	Specifikus aktivitás ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	k_{cat} (s^{-1})	K_m (Na_2S) (μM)	K_m (Kinon) (μM)	k_{cat}/K_m (Na_2S) ($\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	k_{cat}/K_m (Kinon) ($\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)
durokinon	$2,29 \pm 0,19$	1,66	$209 \pm 29,8$	$27,39 \pm 2,47$	0,008	0,061
decilubikinson	$15,13 \pm 0,61$	10,96	$232,3 \pm 27,1$	$24,47 \pm 6,42$	0,047	0,448

1. táblázat – Az Sqn fehérje enzimkinetikai paramétere

4.4. Az Sqn fehérje negyedleges szerkezetének vizsgálata

Az irodalom alapján elmondható, hogy az SQR fehérjét trimer, dimer állapotban kristályosították, azonban az aktív formát nem határozták meg. Így célom volt a negyedleges szerkezet és az szulfid függő durokinon redukáló aktivitás kapcsolatának vizsgálata.



14. ábra – „A” az Sqn denaturáló gélen történő futtatásának képe „B” 3 különböző tisztításból származó Sqn natív western blott képe, „C” a fehérjék szulfid függő kinon redukálási aktivitása

Habár a denaturáló gélen az Sqn egy sávban jelenik meg (14. ábra „A”), a natív-western hibridizációt követően már három jól elkülöníthető sávot lehet azonosítani (14. ábra „B”). Ezek a fehérje sávok feltehetőleg trimer (legfelső nyíl által jelölt sáv), dimer (középső nyíl által jelölt sáv), és monomer (alsó nyíl által jelölt sáv) állapotban lévő Sqn fehérjék. A negyedleges szerkezet és a szulfid függő durokinon redukáló aktivitás közötti kapcsolat igazolása érdekében, különböző asszociációs mintázattal rendelkező fehérje mintákon mértem az Sqn által katalizált reakciót. (14. ábra „C”) Azoknak a fehérje mintáknak volt magasabb a szulfid függő durokinon redukáló aktivitása, amelyekben a trimer és dimer sávokban található formák mennyisége nagyobb volt, mint annak a fehérje mintának, amelyben a monomer sávban volt több fehérje.

4.5. Az aktív centrumot kialakításában és a FAD kötésében szerepet játszó aminosavak azonosítása Sqn fehérjében

4.5.1. *T. roseopersicina* szulfid kinon reduktáz 2 (Sqn) aminosav mutáns fehérjét termelő expressziós vektorok elkészítése

Irodalmi adatok alapján elmondható, hogy az eddig vizsgált SQR fehérjékben a főbb katalitikus funkciókat (szulfid kötés és oxidáció, FAD kötés és koordináció) konzervált ciszteinek látják el. A *Thiocapsa roseopersicina* Sqn fehérje szekvenciájában több konzervált aminosav is azonosítva lett az *in silico* analízisek során, melyek a FAD kofaktor megkötésében illetve az aktív centrum kialakításában is szerepet játszhatnak. A konzervált aminosavak funkciójának meghatározásához az adott aminosavakban mutáns fehérjék előállítására volt szükségem. Kutatócsoportunk korábbi vizsgálatai alapján elmondható, hogy az Sqn fehérjében található FAD kofaktor kovalensen kötött, így célom volt megvizsgálni, hogy az irodalomban leírtakhoz hasonlóan az Sqn fehérjében is az első konzervált cisztein (Cys128) felel a FAD kofaktor kötéséért, illetve hogy a 333. pozícióban lévő cisztein valóban a szulfid kötéséért

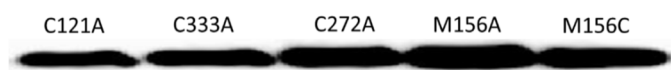
felelős. Továbbá célom volt megvizsgálni a VI. típusú SQR fehérjékre jellemző 156. pozícióban lévő metionin, valamint 272. pozícióban lévő cisztein funkcióját. Ezért a ciszteineket (Cys128, Cys272, Cys333) alaninra, valamint a VI. típusú SQR fehérjékre jellemző 156. pozícióban lévő metionint alaninra illetve ciszteinre terveztem cserélni irányított mutagenzis segítségével. A vizsgálandó pontmutáns Sqn enzimek Strep II affinitás peptiddel ellátott változatait *T. roseopersicina* törzsekben való termeltetésük után a tisztításukat affinitás kromatográfiával terveztem megvalósítani. Ennek érdekében el kellett készítenem azon expressziós vektorokat, amelyek az aminosav mutáns fehérjéket képesek kifejezni.

Az expressziós vektorok elkészítésének első lépéseként a *T. roseopersicina* klónozó vektorba épített vad típusú *sqn* génjén irányított mutagenezist végeztem. A reakció során a templárról (pBSQNNNS) az adott mutációt hordozó előre- illetve visszamutató primerektől kiindulva a hozzáadott dNTP és Phusion polimeráz segítségével alakítottam ki a pontmutációkat hordozó vektorokat. DpnI enzimmal emésztettem az *in vitro* szintézis termékeit, melyeket utána *E. coli* Novablue sejtekbe transzformáltam, ezt követően kanamicin tartalmú LB lemezekre szélesztettem. Azáltal, hogy a DpnI enzim csak a metilált DNS szálakba hasít bele, az *E. coli* DNS polimeráza csak a sértetlen, pontmutációt hordozó szálakat képes átírni. A DNS szekvencia tervezett módon bekövetkező módosítását és a transzformáció sikerességét kolónia PCR segítségével ellenőriztem. Mivel az ellenőrző PCR reakcióhoz felhasznált primerek csak akkor voltak képesek letapadni a templátra, ha a mutáció jelen volt, így csak akkor kaptam terméket, ha a mutagenézis sikeres volt.

A következő lépésként a mutációt szenvedett géneket a pDSK6CrtKm expressziós vektorba építettem be úgy, hogy a Strep II affinitás peptidet kódoló DNS szakasz leolvasási kerete ne sérüljön. A pontmutációt hordozó *sqn* géneket tartalmazó pBSQNNNS-C121A; -C272A; -M156A; -M156C; -C333A vektorokat HindIII endonukleázzal hasítottam. Az így kapott túlnyúló végeket feltöltöttem Klenow enzimmal, végül NdeI restrikciós endonukleázzal emésztettem meg a vektorokat. Fragment izolálással nyertem ki a mutáns *sqn* géneket tartalmazó DNS szakaszokat, amiket PstI-el emésztett és T4 DNS polimeráz enzim használatával tompított, majd NdeI restrikciós enzimmal meghasított és foszforilált pDSK6CrtKm expressziós vektor nagyobb fragmentjével egyesítettem. A ligálást követően kialakult termékeket ebben az esetben is transzformálással juttattam be *E. coli* Novablue sejtekbe, amelyek közül a rekombináns vektorokat hordozó transzformánsokat kolónia PCR segítségével igazoltam, az expressziós vektorra specifikus primer párokkal. Az így kapott pDSQNNNS- C121A; -C272A; -M156A; -M156C; -C333A expressziós vektorokat tartalmazó törzseket szekvenálással ellenőriztem.

4.5.7. A pontmutációt hordozó Sqn fehérjét termelő törzsek létrehozása

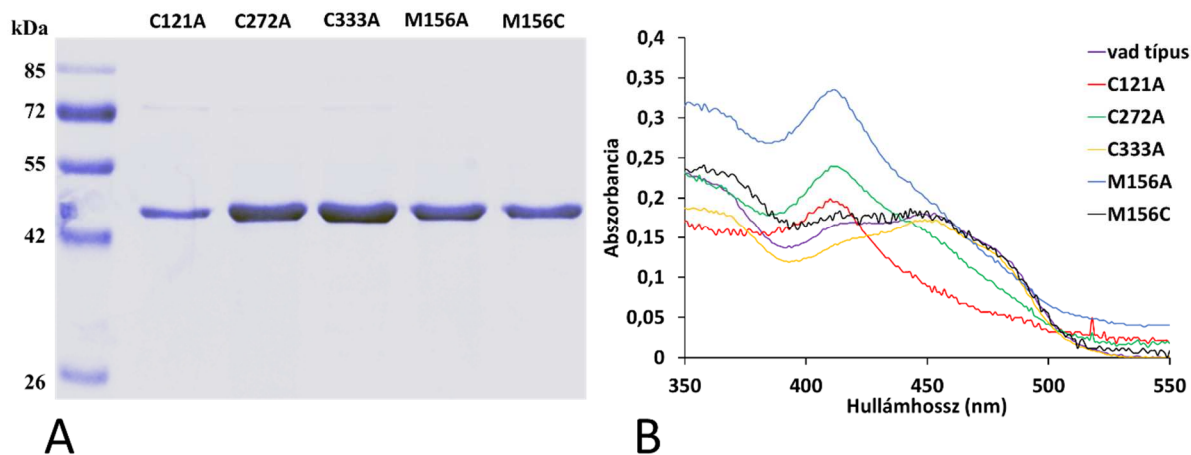
Az általam létrehozott pDSQNNs - C121A; -C272A; -M156A; -M156C; -C333A expressziós vektorokat *E.coli* S17 sejtekbe transzformáltam, majd konjugációval juttattam be a *T. roseopersicina* FOQRON törzsbe. Az így létrehozott *T. roseopersicina* FRNSQNN- C121A; -C272A; -M156A; -M156C; -C333A törzsek már a pontmutációt hordozó rekombináns Sqn fehérjét termelik. A sejtvonalak fehérjetermelő képességét teljes sejtes mintákon western hibridizáció segítségével igazoltam. A western hibridizáció során csak akkor kaptam jelet, ha a rekombináns, StrepII affinitás peptiddel ellátott Sqn jelen volt (15. ábra).



15. ábra – A pontmutáns Sqn fehérjét termelő törzsek rekombináns fehérje expressziójának ellenőrzése western hibridizációval

4.5.8. A pontmutációt hordozó Sqn fehérjék vizsgálata

A vizsgált és módosított aminosavaknak az enzim működésében betöltött szerepének vizsgálata érdekében az egyes mutáns fehérje változatokat 2 liter térfogatú megfelelő *T. roseopersicina* kultúrákkal termeltettem, majd a korábban kidolgozott módszerrel szolubilizáltam és tisztítottam. Azonos térfogatú kultúrákból különböző mennyiségű fehérjét sikerült tisztítanom. Az Sqn fehérje változatok kitisztított mintáit denaturáló gélelektroforézissel ellenőriztem (16. ábra „A”).

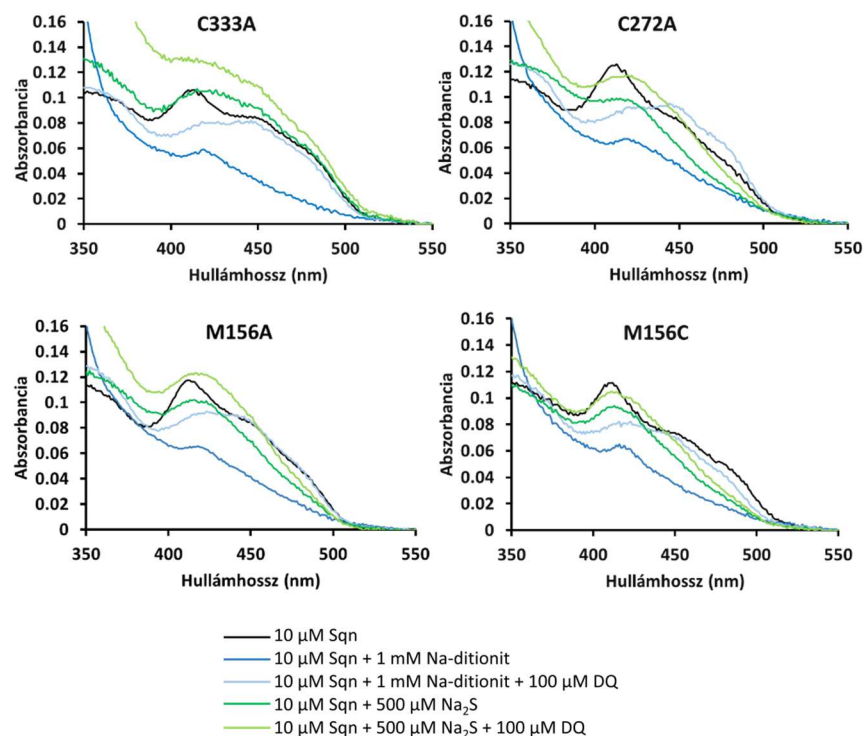


16. ábra – A tisztított pontmutációt hordozó Sqn fehérjék SDS-PAGE képe (A) és az összenormált abszorbancia spektrumuk (B)

Meghatároztam a mutáns Sqn fehérjék abszorpciós spektrumát. Az abszorpciós spektrumok jobb összehasonlíthatósága érdekében azokat a vad típusú fehérje abszorbancia spektrumához tartozó minden fehérjére jellemző 280 nm hullámhosszon található elnyelési csúcshoz normáltam (16. ábra „B”). Abban az esetben, ha az első konzervált ciszteint alaninnal helyettesítettem, a tisztított fehérje nem tartalmazott FAD kofaktort. A C272A variáns esetében

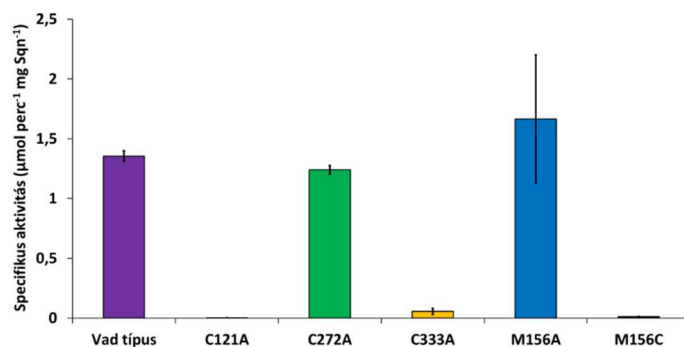
a tisztított fehérje abszorbancia spektrumában nem lehet egyértelműen az oxidált állapotú fehérjéhez kötött FAD kofaktorra jellemző elnyelési csúcsokat, ez redukált állapotban tisztított fehérjékre utal. A C333A és M156C Sqn variánsok esetében a tisztított fehérje abszorbancia spektrumában jól azonosíthatóak az oxidált állapotú fehérjéhez kötött FAD jellegzetes elnyelési csúcsai. A VI. típusú fehérjékre jellemző 156. pozícióban lévő metionin alaninnal történő helyettesítése esetén a fehérjében azonosíthatóak a FAD kofaktor jellegzetes elnyelési csúcsai.

A pontmutáns Sqn fehérjék redox működését valamint FAD kofaktor tartalmát a vad típusú Sqn fehérjéhez hasonlóan vizsgáltam, elektron donorként 1 mM nátrium-ditionitot illetve 500 μ M nátrium-szulfidot, elektron akzeptorként pedig durokinont alkalmazva (17. ábra). A nátrium-ditionit egy rendkívül erőteljes, a szulfiddal ellentétben aspecifikus elektron donor, így a vizsgált Sqn fehérje variánsok közül (C272A, C333A, M156A, M156C) mindegyikben található FAD kofaktort hatékonyan elredukálta. A nátrium-ditionit által elredukált fehérje minták abszorbancia spektrumában 100 μ M durokinon elektron akceptor hozzáadása után újból megjelentek a nátrium-ditionit által korábban kioltott, az oxidált állapotú fehérjéhez kötött FAD jellegzetes elnyelési csúcsai 450 és 480 nm hullámhosszokon. Ezzel szemben a szulfid, mely a vad típusú fehérje természetes elektron donora, nem volt képes elredukálni a C333A Sqn variánsban található FAD kofaktort, viszont a többi vizsgált Sqn variáns a vad típusú fehérjéhez hasonlóan elredukálható szulfiddal és durokinon hozzáadásával visszaoxidálható. Az M156C fehérje esetén az enzimben lévő FAD szulfiddal sikeresen elredukálható, viszont durokinon hozzáadásával nem kapjuk vissza az oxidált fehérjéhez kötött FAD kofaktorra jellemző elnyelési csúcsokat. A C272 Sqn variáns esetében a szulfid hatékonyan elredukálta a fehérjében lévő FAD kofaktort, azonban a durokinon hozzáadásával nem a tisztított fehérje abszorbancia spektrumát kaptuk vissza, hanem egy teljesen oxidált állapotú SQR fehérjére jellemző abszorbancia spektrumot, mely azt jelenti, hogy a fehérje mintában redukált és oxidált állapotú fehérjék is lehetnek.



17. ábra – Az Sqn variánsok FAD kofaktor tartalmának és redox működésének vizsgálata.

Megvizsgáltam továbbá a tisztított pontmutáns fehérjék szulfid függő durokinon redukáló aktivitását (18. ábra). Azt tapasztaltam, hogy az első konzervált cisztein alaninra történő cseréje esetén a fehérje (C121A) szulfid függő durokinon redukáló aktivitással nem rendelkezik. Abban az esetben, ha a 272. pozícióban lévő ciszteint alaninra cseréltem (C272A), a szulfid függő kinon redukáló aktivitásában nem következett be jelentős változás. Ha a feltételezhetően a szulfid kötésében szerepet játszó 333. pozícióban lévő konzervált ciszteint alaninra változtattam (C333A), az enzim szulfid függő kinon redukáló aktivitása jelentősen lecsökkent a vad típusú fehérjéhez képest. Ha a VI. típusú SQR fehérjék alcsaládjára jellemző 156. pozícióban lévő metionint alaninra cseréltem (M156A), a szulfid függő durokinon redukáló aktivitásban nem következett be jelentős változás. Ha a 156. pozícióban lévő metionint ciszteinre cseréltem (M156C), szulfid függő durokinon redukációt csekély mértékben volt képes katalizálni.



18. ábra – A pont mutációt hordozó Sqn fehérjét szulfid függő durokinon redukáló aktivitása

5. Diszkusszió

5.1. A fehérjetisztítási módszer fejlesztése

Az SQR fehérjéket az irodalom szerint az esetek többségében detergenssel szabadították fel a membránból (Lencia és mtsi 2012, Marcia és mtsi 2010). Annak az oka, hogy sikeresen tudtam kaotróp sóval (NaBr) leválasztani az Sqn fehérjéket a membránról az lehet, hogy az olyan VI. típusú SQR fehérjéknek, mint amilyen az Sqn, jóval rövidebb a C terminális régiójuk, mint a többi SQR fehérjének. A C terminális hossza illetve szerkezete befolyásolhatja az oligomerizációt, és a membránból való felszabadíthatóság mértékét is, illetve a membránba való kijutást. Egy III. típusú SQR fehérje esetén írták le, hogy a C terminális utolsó 21 aminosavának eltávolításával a fehérje nem volt képes a membrán periplazmatikus oldalára kerülni, hanem a citoplazmában ragadt és szulfid függő decilubikinon redukáló aktivitása sem volt. (Lencia és mtsi 2010).

5.2. A vad típusú fehérje redox aktív kofaktort tartalmának igazolása természetes elektron donorral

A csoportunkban folytatott korábbi munkák során az Sqn fehérje redox aktív FAD kofaktor tartalmát igazolták nátrium-ditionittal történő elredukálással, azonban ez nem természetes elektron donorja a szulfid kinon oxidoreduktáz enzimeknek. Mivel a nátrium-ditionit nagyon alacsony redoxpotenciállal rendelkezik, ezáltal egy általános redukálószer. Ezzel szemben a szulfid csak akkor képes elredukálni a fehérje aktív centrumában lévő FAD kofaktort, ha a fehérje megköti a szulfidot. A szulfiddal történő elredukálás valamint a kinonnal való visszaoxidálás sikeres volt, így ezzel a kísérlettel sikeresen igazoltam, hogy az Sqn képes a szulfid függő kinon redukcióra, így biokémiai vizsgálatokra alkalmas.

5.3. A vad típusú Sqn fehérje biokémiai jellemzése

A kinon preferencia során azt tapasztaltam, hogy az általam használt kinon vegyületek közül az Sqn inkább az ubikinon típusú kinon vegyületeket fogadta el elektron akceptornak, mivel az általam vizsgált lehetséges elektron akceptorok közül csak ezen kinon vegyületeknek volt képes a szulfidból származó elektront átadni. Ez magyarázható azzal, hogy az ubikinon típusú kinon vegyületek középponti redoxpotenciálja általánosan 150 mV-tal magasabb, mint a menakinon típusú kinon vegyületek középponti redoxpotenciálja (Schoepp-Cothenet és mtsi 2009), de a jelenség hátterében állhatnak fehérje szerkezeti tényezők is.

A hőmérséklet függés vizsgálata alapján elmondható, hogy a fehérje szulfid függő durokinon redukáló aktivitásának optimális hőmérséklete 55°C, ellenben 60°C fokon az aktivitás

megszűnik. Ebből arra lehet következtetni, hogy a 60°C-on a fehérje nincs aktív állapotban, melynek elsősorban a szerkezetben bekövetkezett változások lehetnek az okai. Habár az Sqn fehérje hőmérsékleti optimuma 55°C, a *T. roseopersicina* nem képes növekedni 28°C feletti hőmérsékleten, így a további méréseket 25°C-on végeztem, mely a *Thiocapsa roseopersicina* optimális növekedési hőmérséklete.

A szubsztrát koncentráció függés vizsgálatok eredményeiből jól látszik, hogy a fehérje affinitása az alkalmazott két kinonhoz hasonló értékeket mutat, azonban a reakció sebesség szempontjából a decilubikinont jóval gyorsabban volt képes a fehérje elredukálni. Ez a sebesség különbség feltehetőleg a redoxpotenciál különbségből adódik. Az enzimreakció sebességének a szulfid koncentrációtól való függését szintén decilubikinon és durokinon szubsztrátokkal vizsgáltam, a kísérletek eredménye alapján elmondható, hogy az Sqn affinitása a szulfidhoz a két elektron akceptor mellett hasonló. Ez a K_m érték az eddigi adatok alapján egy új nagyságrendet képvisel az SQR fehérjék között, elvégre a legtöbb SQR enzim esetében mikromólos nagyságrendű K_m értékeket, valamint a II. típusú SQR fehérjék esetén milimólos nagyságrendet írtak le (2. táblázat).

SQR alcsalád	K_m érték (szulfid)	Referencia
I. Típus	5-42 μM	Marcia és mtsi 2010
II. Típus	23-2000 μM	Theissen és mtsi 2008, Vande és mtsi 1999
III. Típus	77 μM	Lencina és mtsi 2013
V. Típus	2 μM	Brito és mtsi 2009
VI. Típus	209 μM	Ez munka

2. táblázat – A különböző SQR alcsaládokba tartozó enzimekre jellemző és meghatározott szulfid szubsztrátra vonatkozó K_m értékek

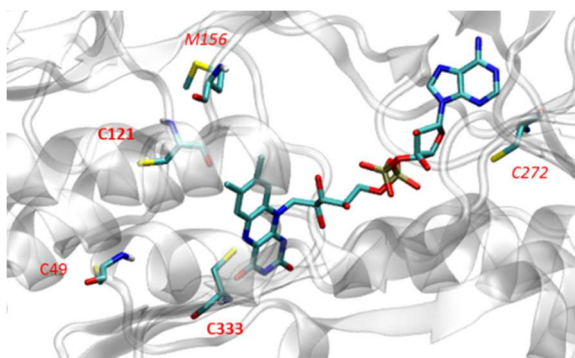
5.4. A negyedleges szerkezet vizsgálata

Az elmúlt évek során több SQR fehérje kristály szerkezete lett meghatározva, és az esetek többségében ezek a fehérjék homotrimer illetve homodimer formában voltak jelen a fehérjekristályban (Marcia és mtsi, 2009). Natív-western hibridizáció vizsgálatok eredménye szerint az Sqn fehérjét feltehetően legalább 3 féle negyedleges szerkezetben lehet tisztítani. Ezek feltételezéseink szerint trimer, dimer és monomer állapotú fehérjék. Nem állnak rendelkezésre eddig egyértelmű irodalmi adatok az SQR fehérjék negyedleges szerkezetének és szulfid függő kinon redukáló aktivitásának kapcsolatáról, azonban a vizsgálataim alapján elmondható, hogy van kapcsolat a negyedleges szerkezet és az enzim aktivitása között. Ez eredmények alapján elmondható, hogy a monomerek feltehetőleg nem aktívak, vagy alacsony aktivitással rendelkeznek.

5.5. Az Sqn enzim által végzett katalízisben feltehetőleg szerepet játszó aminosavak azonosítása

Az SQR fehérjékben az aktív centrumban lévő FAD kötésében, illetve a szulfid kötésében és oxidációjában feltehetőleg szerepet játszó konzervált aminosavakat korábban *in silico* analízissel azonosították (Marcia és mtsi 2009). Az Sqn fehérjében ezek az aminosavak nem teljesen ugyanazon a pozíciókban találhatóak, mint a többi SQR fehérjében, így az *in silico* analízis nem nyújthat megfelelő választ a kérdésre, hogy mely aminosavaknak van kiemelkedő szerepe az enzim működésében (19. ábra). Azért, hogy a katalízisben betöltött szerepüket tisztázzam, a konzervált ciszteineket (C121, C272, C333) célzott mutagenézissel alaninra cseréltem, valamint a IV. típusú SQR fehérjékre jellemző 156. pozícióban lévő metionint alaninra, illetve ciszteinre cseréltem. Habár az Sqn fehérjében van egy negyedik cisztein (Cys49) is, azonban nem konzervált, ezért nem került sor a vizsgálatára.

Az irodalom alapján elmondható, hogy az első konzervált cisztein a felelős a FAD kovalens kötéséért (Marcia és mtsi 2009). Abban az esetben, ha a 121. pozícióban lévő ciszteint alaninra cseréltem, akkor az Sqn nem képes katalizálni a szulfid függő durokinon redukciót, és az abszorbancia spektrum alapján feltehetőleg nem is tartalmaz FAD kofaktort. Az *A. ferrooxidans* SQR enzime esetén tapasztaltak ehhez hasonlót, azonban abban az esetben, ha a második konzervált ciszteint (Cys160) cserélték alaninra. (Cherney és mtsi, 2010).



19. ábra – A vizsgálatra kijelölt aminosavak elhelyezkedése az Sqn fehérje szerkezeti modelljében
(Beke és Tóth, személyes közlés)

Az *A. aeolicus* SQR enzimében is jelenlévő, a szulfid kötésében szerepet játszó két konzervált cisztein (Cys159 és Cys353) közül csak egyik található meg a *T. roseopersicina* Sqn enzimjében. Abban az esetben, ha a 333. pozícióban lévő ciszteint alaninra cseréltem, az Sqn az abszorbancia spektrum alapján tartalmazott FAD kofaktort, ellenben szulfid függő kinon redukáló aktivitása töredékére csökkent. Ugyanezekre az eredményekre jutottak az irodalom szerint, ha az *A. ferrooxidans* Sqr enzimében 356. pozícióban található konzervált ciszteint alaninra cserélték, továbbá igazolták hogy a fehérjében lévő FAD kofaktort nem lehet szulfiddal

elredukálni. Ebből arra lehet következtetni, hogy az Sqn esetén a 333. pozícióban lévő cisztein a szulfid kötésében és/vagy a szulfid oxidáció reakcióciklusában játszik szerepet (Cherney és mtsi, 2010).

A *T. roseopersicina* Sqn fehérje szekvenciájának 272. pozíciójában található ciszteinnel homológ ciszteinek jelenléte az eddig ismert összes VI. típusú SQR fehérjére jellemző, ellenben nem található meg a többi csoportba sorolható SQR fehérjékben. Ha ezt a ciszteint alaninnal helyettesítettem, akkor a tisztított fehérje változatlanul képes volt szulfid függő durokinon redukcióra, azonban az abszorbancia spektruma a vad típusú fehérjéhez képes megváltozott; a jellegzetes fehérjéhez kötött oxidált állapotú FAD kofaktorra jellemző 450 és 480 nm hullámhoszon található elnyelési csúcsok kevésbé karakteresek. Mivel az enzim aktivitása nem változott a vad típusú fehérjéhez képest, így valószínűleg az abszorbancia spektrumban bekövetkezett változás oka, hogy a tisztított fehérjék egy része redukált állapotban van, melyet az a tény is alátámaszt, hogy a szulfiddal elredukált, majd a durokinon által visszaoxidált fehérje fényelnyelési spektruma egy teljesen oxidált állapotú SQR fehérjére jellemző abszorbancia spektrum, szemben a tisztított fehérje spektrumával.

A rendelkezésre álló irodalmi adatok alapján elmondható, hogy a szulfid kinon oxidoreduktáz típusú enzimekben a szulfid oxidációért két konzervált cisztein a felelős – *A. aeolicus* SQR enzimében Cys159 és Cys353. Ezen két konzervált cisztein közül a VI. típusú SQR enzimek aminosav szekvenciájában csak egy található meg, a 333. pozícióban lévő cisztein. A másik konzervált cisztein helyett a VI. típusú SQR enzimekben ezen a helyen egy metionin vagy valin található. Ha a 156. pozícióban lévő metionint alaninra cseréltem, a fehérje fényelnyelési spektrumában lehetett azonosítani a FAD kofaktorra jellemző elnyelési csúcsokat, és szulfid függő durokinon redukáló aktivitása sem változott a vad típusú Sqn fehérjéhez képest. Abban az esetben, ha a 156. pozícióban lévő metionint ciszteinre cseréltem, az abszorbancia spektrum alapján a fehérjében volt FAD kofaktor, mely szulfid által elredukálható, azonban szulfid függő durokinon redukcióra nem volt képes az enzim. A 156. pozícióban lévő metionin ciszteinnel történő helyettesítésével egy tiol csoport került az aktív centrum közelébe, mely feltehetőleg befolyásolja az enzim katalitikus működését.

6. Összefoglalás

A szulfid kinon oxidoreduktáz enzimek ősi flavoproteinek, melyeknek jelentőségét mutatja, hogy az élővilág szinte minden fő fejlődési ágán elterjedtek. A szulfid kinon oxidoreduktáz fehérjéket 6 alcsaládba lehet sorolni. Tudományos diákköri munkám során egy eddig még nem jellemzett IV. típusú SQR fehérje családba tartozó enzimet vizsgáltam.

A biokémiai vizsgálatokhoz szükséges nagy mennyiségű fehérje előállítására kidolgoztam egy hatékony, megbízható, lépték növelhető módszert, mellyel nagy mennyiségű és tisztaságú Sqn fehérje készíthető.

Vizsgáltam a fehérje biokémiai tulajdonságait, többek között a fehérje szulfid függő kinon redukáló aktivitásának a pH és hőmérséklet függését, a fehérje kinon preferenciáját, valamint a szubsztrát függését. Több szubsztrátra meghatároztam a kinetikai paramétereket, illetve meghatároztam az enzim aktivációs energiáját. A kinetikai paraméterek alapján elmondható, hogy a VI. típusú SQR fehérjék ezen képviselőjének a szulfidra vonatkozó K_m értéke egy új nagyságrendet képvisel a többi, eddig jellemzett SQR fehérje között. Ez az affinitás érték azt jelzi, hogy ennek a bakteriális szulfid kinon oxidoreduktáznak magas szulfid koncentrációnál lehet fiziológias szerepe a sejtek szulfid anyagcseréjében.

Az előzetes *in silico* analízis eredményeként azonosított aktív centrum kialakításában szerepet játszó aminosavakat célzott mutagenézissel más aminosavakra cseréltem. Előállítottam öt pontmutációt hordozó fehérjét termelő vektort, melyeket konjugációval bejuttattam *T. roseopersicina* törzsekbe, ezen pontmutáns fehérjét termelő törzseket western hibridizációval ellenőriztem. A pontmutációt hordozó fehérjéket termelő törzsekből fehérjét tisztítottam, megvizsgáltam a szulfid függő kinon redukáló aktivitásukat. Többek között igazoltam, hogy az eddig vizsgált SQR fehérjékhez hasonlóan, a *T. roseopersicina* Sqn fehérjében is az első konzervált cisztein felel a FAD kovalens kötéséért, valamint hogy a 333. pozícióban lévő ciszteinnek a szulfid oxidációban lehet szerepe. Továbbá megállapítottam, hogy a VI. típusú SQR fehérjékre jellemző 272. pozícióban lévő konzervált cisztein alaninnal történő helyettesítésével a fehérje szulfid függő durokinon redukáló aktivitásában nem következik be változás, azonban az abszorbancia spektrum alapján elmondható, hogy a fehérje mintában redukált állapotú FAD kofaktort tartalmazó fehérjék is lehetnek. A VI. típusú SQR fehérjékre jellemző 156. pozícióban lévő metionin alaninra történő helyettesítésével nem szűnt meg az aktivitás, azonban ciszteinre történő cseréjével igen, ennek oka feltehetőleg, hogy a bevitt tiol csoport gátolta a reakció ciklust.