

Szegedi Tudományegyetem  
Természettudományi és Informatikai Kar  
Biológia Doktori Iskola

# **A VI. típusú szulfid kinon oxidoreduktáz működési analízise**

Doktori (Ph.D) értekezés tézisei

**Miklovics Nikolett**

**Témavezetők:**

**Dr. Rákhely Gábor**, tanszékvezető, egyetemi docens

**Dr. Tóth András**, tudományos munkatárs

Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Kar

Biotechnológiai Tanszék,

Eötvös Lóránd Kutatási Hálózat (ELKH)

Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Biofizikai Intézet



Szeged

2023



## 1. BEVEZETÉS

A kén esszenciális elem a sejtek számára, legredukáltabb formája a szulfid. A szulfid az aerob és anaerob organizmusok számára is kulcsfontosságú elem, azonban bizonyos koncentráció felett toxikus hatású, mivel gátolja a légzési lánc IV. komplexét. Prokarióták esetén elektrondonorként szolgál. Emlősöknél fontos szerepet tölt be a központi idegrendszerben, a kardiovaszkuláris rendszerben, az angiogenezisben, az izomtónus szabályozásában. A humán szervezetben néhány betegség kialakulásában is szerepet játszhat, mint például az Alzheimer kór. A szulfid oxidációs detoxifikálásában, intra- és extracelluláris szintjének szabályozásában, valamint elektrondonorként való hasznosításában a szulfid oxidáló enzimeknek, a flavocitokróm c (FCC) és a szulfid kinon oxidoreduktázoknak (SQR) van kiemelkedő szerepe. Ezek a fehérjék a két dinukleotid kötő doménnel rendelkező flavoprotein enzim szuperfamilia (tDBDF) tagjai, amelyek három konzervált doménnel rendelkeznek. Az egyik az első Rossmann-fold szerkezet a FAD kofaktort köti. A második Rossmann-fold szerkezet funkciója az FCC és SQR enzimek esetén a szulfid szubsztrát megkötése és oxidációjának katalízise. A harmadik régió a C-terminális domén, az ezen elhelyezkedő aminosavak többek között az elektron akceptor kinon szubsztrátok kötésében és redukációjuk katalízisében vesznek részt. Az SQR enzimek fontosságát mutatja széleskörű elterjedésük, a baktériumoktól az emlősökig megtalálhatóak, a növények kivételével. Evolúciójuk, valamint konzervált szekvencia motívumaik és aminosavaik alapján az SQR enzimeket hat csoportba soroljuk (I-VI. típusú SQR-ek vagy SqrA-F). Közös jellemzőik az aktív centrumban található FAD kofaktor és a konzervált ciszteinek, melyek a katalízisben fontos résztvevők. Az SQR enzimek a szulfid és kinon molekulák közt két lépésben végbemenő redox reakciót katalizálják. A szulfid oxidációs lépés során a szulfidról elektronok jutnak a FAD kofaktorra, melyet proton transzport kíséri. A folyamat eredményeként az oxidálódott kén atomokból egyenes vagy elágazó láncú poliszulfid molekulák épülnek fel. Ezt követi a kinon redukció, mely során a FAD-ról az elektronok a membránból az enzim aktív centrumába belépő kinonokra jutnak és ezt a folyamatot is proton transzport kíséri. Az SQR típusú fehérjék szerkezetéről, működési mechanizmusáról kevés adat áll rendelkezésünkre. A legrészletesebben jellemzett csoport az I. típus. A VI. csoportba tartozó SqrF enzimek kevésbé ismertek. Kutatócsoportunk modellorganizmusa a fotoszintetikus bíbor kénbaktérium, a *Thiocapsa roseopersicina*, melyben korábban azonosított két *sqr* génklasztert, az egyik IV-es, a másik VI-os típusú SqrF enzimet kódol. A csoport kidolgozott egy eljárást a *T. roseopersicina* SqrF fehérje homológ rekombinációs módon való előállítására és tisztítására. Ennek az enzimnek a szerkezete nem ismert, azonban

homológia modellje és biokémiai tulajdonságainak meghatározása alapján csoportunk jellemezte ezt az SqrF fehérjét. Az enzim magasabb aktivációs energiával és alacsonyabb aktivitással, valamint számottevően alacsonyabb szulfidhoz való affinitással rendelkezik a többi vizsgált SQR típusú fehérjéhez képest. Továbbá a konzervált ciszteinek funkciójának vizsgálatával, azok alanin pontmutánsainak segítségével felállítottuk az SqrF enzim által katalizált szulfid oxidáció mechanizmusának modelljét. Azonban a ciszteineken kívül más, az aktív centrumban elhelyezkedő konzervált aminosavaknak is lehet szerepe a szulfid oxidációs lépésben. Az SqrA enzimek esetén konzervált aszparaginsavakról, és glutaminsavról feltételezték, hogy azok a szulfid orientálásában, illetve a szulfid és FAD között létrejövő töltés-transzfer komplex kialakításában és a szulfid oxidációt kísérő proton transzferben lehet szerepe. Az SQR típusú fehérjék esetén a kinon redukció folyamata még kevésbé ismert. A C-terminális domén a kinon redukció helye. Ezt a régiót felépítő amfipatikus hélixek nagy flexibilitással rendelkeznek, ezáltal nehezebb a kristályosításuk. Szerkezet modellezés adatok alapján a C-terminális domén egyes hidrofób aminosavai alakítják ki a kinon kötő csatornát, melyen keresztül a kinon az aktív centrumba, a FAD kofaktor közelébe kerül. A kinon csatornát általánosan elágazó láncú apoláris és aromás aminosavak építik fel. A kinon redukció folyamata azonban jelenleg nem ismert.

## 2. CÉLKITÚZÉS

Célunk tehát az volt, hogy azonosítsuk a *T. roseopersicina* SqrF enzim kinon kötőhelyét kialakító aminosavakat. Ezt az *A. ferrooxidans* SqrA enzim kinon kötőhelyéből kiindulva terveztük elvégezni, mivel ennek a fehérjének a szerkezetét kinon kötő formában is meghatározták. Azonban ez a kinon csatorna eltér az általános formától, mivel ebben az enzimben a megkötött kinon molekulát két aromás aminosav fogja közre. További céljaink között szerepelt a *T. roseopersicina* SqrF fehérjében azonosított kinon kötőhelyet kialakító aminosavak funkciójának megismerése. Mindezek mellett célunk volt a C-terminális régió funkcionális szerepének feltárása mind a membránhoz való kötődésben, mind a katalitikus működésben.

A fentiekhez kapcsolódva terveink között szerepelt a két lépéses redox reakció szulfid oxidációs fázisának részletesebb megismerése. Korábban kutatócsoportunkban a *T. roseopersicina* SqrF konzervált ciszteinek alanin pontmutánsainak kísérletes analízisével azonosítottuk a ciszteinek szerepét a katalitikus működésben. Ezen eredmények alapján pedig felállítottunk egy lehetséges katalitikus modellt, ami eltér a többi SQR működésétől. A ciszteinek mellett a *T. roseopersicina* SqrF Glu163 aminosavnak is lehet szerepe a szulfid oxidáció folyamatában, ugyanis ez az aminosav az összes SQR-ben konzerváltan megtalálható, kivéve az eukariótákban előforduló SqrB csoportot, amelyekben lizin található helyette. Ennek a glutaminsavnak a funkcióját kísérletes módszerekkel még nem vizsgálták SQR fehérjékben, csupán csak feltételezések állnak rendelkezésre a szerepéről. Ezért célunk volt ennek a konzervált glutaminsav funkciójának felderítése különböző alanin és más aminosav pontmutánsok jellemzésével.

### 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A *T. roseopersicina* SqrF szerkezetének modellje homológia modellezés módszerrel a Schrödinger programcsomag alkalmazásával készült el Dr. Paragi Gábor közreműködésével. Egyes modelleket az I-TASSER program alkalmazásával készítettünk el.

A *T. roseopersicina* SqrF kinon kötőhelyét felépítő aminosavak azonosítása a homológia modell felhasználásával, valamint többszörös fehérje szekvencia illesztéssel valósult meg.

A vad típusú SqrF és az SqrF F366A fehérjék fehérje-ligand kölcsönhatásainak *in silico* molekuladinamikai analízisét Dr. Paragi Gábor készítette el REMD/REST módszer alkalmazásával. Ennek segítségével a *T. roseopersicina* SqrF kinon kötőhelyet feltételezhetően felépítő aminosavak és a dUQ közötti kapcsolatokat, valamint a kötések típusát azonosítottuk és ez képezte az alapját a kísérletes vizsgálatoknak.

A statisztikai számításokat Welch-féle kétmintás t-próba alkalmazásával R Studio programban végeztük el.

A DNS manipulációs eljárásokat, helyspecifikus mutagenéziseket, a vektor konstrukciók létrehozását a gyártók utasításainak megfelelően végeztük. A plazmidokat az *E. coli* törzsekbe kémiai transzformálással, a *T. roseopersicina* törzsekbe pedig konjugációval juttattuk be.

Az SqrF fehérjében azonosított vélhetően kinon kötőhely aminosavak, a C-terminális  $\alpha$ -hélix és a Glu163 aminosav szerepét irányított mutagenézissel létrehozott pont-, dupla- és hármas mutánsok, valamint egy C-terminális  $\alpha$ -hélix deléciós mutáns fehérjeváltozatok biokémiai analízisével tanulmányoztuk.

A *T. roseopersicina* SqrF vad típusú és pontmutáns fehérjeváltozatait Strep II affinitás peptiddel fuzionáltatott homológ rekombináns módon, *T. roseopersicina* sejtekben termeltettük. A rekombináns SqrF fehérjét *T. roseopersicina* membrán frakcióból nátrium-bromid kezeléssel szolubilizált mintákból affinitás kromatográfiával tisztítottuk.

A tisztított vad típusú és pontmutáns SqrF fehérjevariánsainak analitikai vizsgálatait denaturáló poliakrilamid gélelektroforézissel végeztük. A rekombináns fehérjék specifikus detektálását, valamint az SqrF különböző frakciókban való azonosítását Western-blot hibridizációval végeztük Strep II affinitás peptid ellenanyag alkalmazásával.

Az SqrF fehérjevariánsok és FAD kofaktor közötti kovalens kötést a fehérje denaturáló poliakrilamid gélelektroforézisét követően a gél UV fényel való megvilágításával, a fehérje sáv fluoreszcenciájának kimutatásával igazoltam.

A tisztított SqrF fehérjeváltozatok redox-aktív FAD kofaktor tartalmát, valamint a redox állapotot és a redukálhatóságot a különböző variánsok abszorpciós spektruma alapján, a FAD kofaktor fényelnyelési maximumainak (360 és 480 nm hullámhosszúságok) azonosításával igazoltuk. Az SqrF enzimváltozatok szulfid függő kinon redukáló aktivitását szintén UV-Vis spektrofotométer alkalmazásával vizsgáltuk.

A vad típusú és kinon kötőhely mutáns SqrF enzimváltozatok kinetikai paramétereit a különböző enzimaktivitás értékekre történő nem lineáris regressziós illesztéssel, MatLab program használatával határoztuk meg.

#### 4. EREDMÉNYEK

Kutatásaink során a *T. roseopersicina* SqrF fehérje katalitikus működését vizsgáltuk, az abban résztvevő aminosavakat azonosítottuk, szerepüket jellemeztük. Az SqrF enzimből lejátszódó redox reakció szulfid oxidáció és kinon redukció lépéseit egyaránt vizsgáltuk. Kutatócsoportunk korábbi eredményei alapján az enzim katalitikus jellemzői, valamint a katalitikus működés szulfid oxidációs lépésének mechanizmusa eltérnek a többi SQR esetén megismertektől. Ezért további, részletes vizsgálatok szükségesek a teljes katalitikus működés megismeréséhez.

- A *T. roseopersicina* SqrF fehérje kristályszerkezete nem ismert, ezért dUQ kötött formában kristályosított SQR enzimek szekvenciáival való összehasonlítással azonosítottuk a C-terminális régió elhelyezkedő kinon kötőhelyet felépítő aminosavakat. Ezen eredmények alapján a kinon csatornát a Val331, Ile333 és Phe366 hidrofób aminosavak hozzák létre. Ez az SQR típusú fehérjék között az általánosan előforduló elrendeződés, amikor az egyik oldalon két apoláris, a másikon egy aromás aminosav fogja közre a kinon kötőhelyet.
- Az SqrF-dUQ közti kölcsönhatásokat *in silico* molekuladinamikai modellezéssel határoztuk meg. A szimulációval létrehozott 2500 enzim-ligand komplex szerkezetben, melyek feltehetően teljeskörűen reprezentálták az összes lehetséges kialakuló szerkezetet, a dUQ a legtöbb esetben a Val331, Ile333 és Phe366 aminosavakkal lépett kapcsolatba. A modellek szerint a ligand oxo csoportjai hidrogénkötéssel kapcsolódnak a Val331 és Ile333 aminosavakkal, azonban egy időben csak az egyikkel. Az *in silico* modellezés alapján a kinon egyféle orientációban helyezkedik el a csatornában. Ezt igazolta, hogy a dUQ feji régiójának O4 csoportja csak a Val331-el, a ligand O1 csoportja pedig csak az Ile333 aminosavval lépett kölcsönhatásba. A dUQ a Phe366 aminosavval a szerkezetek többségében hidrofób kötésen keresztül lépett kapcsolatba.
- A vizes közegben elhelyezett és vizsgált *in silico* modellek egy részében a dUQ az SqrF Trp369 aminosavával is kölcsönhatásba lépett hidrofób kötésen keresztül. Ez az aminosav a dUQ decil oldalláncával alakíthatott ki kapcsolatot, ugyanis a Trp369 a kinon kötő csatorna bejáratánál helyezkedik el. Azonban lehetséges, hogy *in vivo* körülmények között a fehérje membránnal érintkező felszínén elhelyezkedő

Trp369 nem a dUQ decil oldalláncával, hanem a sejtmembránt alkotó lipid molekulákkal lép kölcsönhatásba.

- Az SqrF-dUQ szerkezeti modellekben a ligand benzokinon feji régiójának O2 oxo csoportja helyezkedik el legközelebb a FAD izoalloxazin gyűrűjéhez. Az *A. ferrooxidans* SqrA kristályosított fehérjében szintén ez az elhelyezkedés figyelhető meg és itt a FAD izoalloxazin O4-dUQ benzokinon fej O2 távolság 3 Å, ami lehetővé teszi a közvetlen elektrontranszfert. A *T. roseopersicina* SqrF fehérjében ez a távolság nagyjából kétszer nagyobb ( $5,3 \pm 0,3$  Å), ami még szintén elegendően kicsi távolság a közvetlen elektronátadáshoz a molekulák között. Az SqrF enzim esetén ez a nagyobb távolság magyarázata lehet az alacsonyabb specifikus aktivitásnak a többi jellemzett SQR-hez képest.
- A meglévő *T. roseopersicina* SqrF homológia modellben a Phe366 aminosavat a kisebb helyigényű alaninra cseréltük. Ezzel vizsgáltuk, hogyan változik a fehérje szerkezete és az aminosav-ligand kapcsolat egy kinon kötőhelyben létrehozott mutáció hatására. Az SqrF F366A modellben a dUQ több olyan aminosavval is kapcsolatba lépett, amellyel a vad típusú SqrF-ben nem alakított ki kölcsönhatást. Azonban a kialakuló szerkezetek kisebb részében lépett kapcsolatba a ligand a Val331, Ile333 és az Ala366 aminosavakkal. Tehát nem tudott megfelelően kialakulni a kinon csatorna a fenilalanin hiányában és a dUQ a fehérje mélyebb részeibe is el tudott jutni.
- Az *in silico* modellezés módszerekkel azonosított a *T. roseopersicina* SqrF kinon kötőhelyét felépítő aminosavakat pontmutáns fehérjék létrehozásával vizsgáltuk. Ezekben alaninra és más aromás aminosavakra cseréltük a meglévőket. Egyszeres-, dupla-, és hármasmutánsok készültek.
- Azok a fehérjevariánsok, amelyek hordozták az I333A mutációt nem voltak tisztíthatóak. Ez arra utal, hogy az Ile333 megváltoztatásának nemcsak a kinon kötőhely megfelelő kialakulására van hatással, hanem egyéb, általánosabb hatása is van.



- Western-blot analízissel kimutattuk az SqrF enzimvariánsokat a membrán frakcióban. Abszorpciós spektrumaik alapján a tisztított SqrF változatok tartalmaztak FAD kofaktort. A minták SDS-PAGE analízise alapján a kofaktor, a vad típusú SqrF enzimhez hasonlóan, kovalens kötéssel kötődik minden mutáns enzimváltozathoz.
- A tisztított SqrF enzimvariánsok aktivitása minden változás hatására csökkent a vad típusú SqrF fehérjéhez képest. Kinetikai paramétereiket tekintve affinitásuk vagy nőtt, vagy nem változott a dUQ-val a vad típushoz képest. Az alaninra cseréléssel a csatorna kiszélesedett, az aromás aminosavakra történő cserében a szubsztrát-fehérje kölcsönhatások növekedésével magyarázhatók a változások.
- Az összes SqrF enzimvariáns affinitása csökkent a DQ-hoz. Ennek az lehet az oka, hogy míg a dUQ csak egyféle orientációban képes beépülni a csatornába, feltehetően a decil oldalcsoportjának köszönhetően, addig a DQ különféle orientációkban beléphet, így azonban az elektrontranszfer valószínűsége csökken.
- A Val331 alaninra cserélése inaktív fehérjét eredményezett. Az SqrF V331F variáns esetén az aktivitás jelentősen csökkent, azonban az affinitás nőtt a dUQ-hoz. Tehát ebben az elrendezésben két fenilalanin építi fel a kinon csatornát, azonban nem növeli az aktivitást.
- Az SqrF I333F mutánsban a töltés transzfer (CTC) komplex nem tudott kialakulni, amelyen keresztül a szulfid-FAD elektronátmenet megvalósul. Tehát ennek az aminosavnak a változása nemcsak a kinon redukció folyamatát befolyásolja, hanem feltehetően közvetett módon a szulfid oxidációs lépésre is hatással van. Ezzel magyarázható az is, hogy ennek a variánsnak volt a legalacsonyabb az aktivitása.
- A Phe366 aminosav alaninra és tirozinra való cserélésével az aktivitás jelentős mértékben csökkent, azonban az affinitás ezeknél a variánsoknál nőtt a legnagyobb mértékben a vad típusú és többi SqrF változattal összehasonlítva. Az alanin mutánsnál a kinon kötő csatorna mérete nőtt meg, azonban az SqrF F366Y variánsnál nem történt jelentős méretbeli változás. Ezekben a mutánsokban feltételezhetően a FAD-kinon közti elektronátadás valószínűsége csökken.

- Létrehoztunk egy C-terminális  $\alpha$ -hélix deléciós (CTD) mutánst annak érdekében, hogy vizsgáljuk ennek a szerkezeti elemnek a szerepét a membránhoz való horgonyzódásban.
- A CTD variáns a várttól eltérően a membrán frakcióban volt azonosítható Western-blot analízissel. Azonban nagyobb mennyiségben lehetett tiszta fehérjét előállítani belőle a többi SqrF variánshoz és a vad típushoz képest, ami arra utal, hogy a C-terminális  $\alpha$ -hélix hiányában könnyebben szolubilizálható a fehérje. Tehát ez a régió részt vesz a membránhoz való kötődésben, azonban nem esszenciális abban.
- Korábban, az irodalom szerint csak inaktív C-terminális  $\alpha$ -hélix deléciós variánsokat sikerült előállítani más típusú SQR - egy-egy SqrA és SqrC - fehérjékből. Azonban a CTD variáns rendelkezett szulfid függő kinon redukáló aktivitással. Ráadásul magasabb aktivitást mutatott, mint az összes mutáns SqrF variáns. Ami érdekes, hogy a Phe366 pontmutánsai nagyobb aktivitáscsökkenést eredményeztek, mint ezt az aromás aminosavat is tartalmazó egész régió eltávolítása.
- A CTD variáns affinitása a dUQ-hoz és a hatékonysága is hasonló volt a vad típusú SqrF enzimhez, azonban az aktivitása közel a fele volt. A C-terminális  $\alpha$ -hélix eltávolításával a kinon kötő csatorna kiszélesedik, így a dUQ könnyebben hozzá tud kötődni az SqrF fehérjéhez és könnyebben bejut a FAD izoalloxazin gyűrűjének közelébe az aktív centrumban. Azonban a fontos elemek hiánya következtében (Phe366 aminosav és a teljes C-terminális  $\alpha$ -hélix) az elektronátadás valószínűsége kisebb, mivel a dUQ optimális helyzetben való kötődése csökken.
- A hőmérsékletfüggés vizsgálatok alapján a CTD variáns aktivitásának a hőmérsékleti optimuma a legalacsonyabb hőmérsékletű (30 °C) a vizsgált SqrF enzimváltozatok között. Azonban ennek a variánsnak a legmagasabb az aktivációs energiája. Tehát az elektrontranszfer számára a FAD és a kinon ebben a fehérjében van a legkedvezőtlenebb helyzetben, azonban így is végbe tud menni az elektronátadás.

- A hőstabilitás vizsgálatok alapján a CTD variáns és a vad típusú SqrF fehérje hasonló, a hőmérséklet növelésével stabilitásukból nem veszítenek. Tehát a CTD variáns nagyfokú hőérzékenységének nem a fehérjeszerkezet stabilitás csökkenése az oka. A C-terminális  $\alpha$ -hélix hiánya flexibilisebbé teheti a fehérjét és megnöveli a kinon számára a FAD kofaktor elérését biztosító csatorna méretét, ezért a dUQ többféle, kevésbé meghatározott orientációban tud beépülni a fehérjébe, ez pedig csökkenti az elektrontranszfer valószínűségét.
- A *T. roseopersicina* SqrF konzervált Glu163 aminosav szerepének meghatározása érdekében alanin, aszparaginsav, lizin, glutamin és szerin pontmutációkat hoztunk létre helyspecifikus mutagenezissel.
- Az SqrF E163K variánst tartalmazta a membrán frakció, azonban tisztítani nem sikerült.
- A többi Glu163 SqrF variánst sikerült tisztítani. Abszorpciós spektrumaikban a fényelnyelési maximumaik 360 és 480 nm-nél voltak azonosíthatóak, ami alapján tartalmaznak FAD kofaktort.
- Az SqrF E163A és SqrF E163S fehérjeváltozatok szinte teljesen oxidált állapotúak voltak az abszorpciós spektrumaik alapján. Tehát nem vettek fel elektront. Lehetséges, hogy nem voltak képesek a szulfid oxidációjára.
- Az SqrF E163A variánst nátrium-ditionittal teljesen el lehetett redukálni, majd DQ hozzáadásával teljesen oxidált állapotba került. Szulfid hozzáadására azonban nem változott az SqrF E163A spektruma, míg a vad típusú SqrF ilyen kezelés hatására redukálódott. Tehát a Glu163 aminosavnak a katalízis szulfid oxidációs lépésében lehet szerepe.
- A Glu163 SqrF variánsok DQ-val nem mutattak aktivitást, míg dUQ-val az abiotikus reakciónál kisebb sebességgel ment végbe a kinon redukciója. Az abiotikus reakció során szulfid hozzáadására a dUQ redukálódik enzimmentes körülmények között is. Lehetséges, hogy a Glu163 cseréjével képes az SqrF enzim a redukált dUQ-t oxidálni oxidált állapotú kén közreműködésével.

- Az enzimmennyiség növelésével a jelenség még erőteljesebben volt megfigyelhető, még inkább eltért a dUQ redukciójának sebessége az abiotikus reakciótól a Glu163 SqrF variánsok jelenlétében.
- A dUQ koncentráció csökkentésével is erőteljesebb volt a hatás és minél magasabb volt a dUQ koncentráció annál kisebb volt az eltérés az abiotikus és az enzimet tartalmazó reakció között.
- A pH függés vizsgálata során a legnagyobb eltérés az abiotikus reakciótól pH=8,00 értéken volt mérhető. A vad típusú SqrF enzim szintén pH=8,00 értéken mutatta a legmagasabb aktivitást. Az SqrF E163A enzimvariáns pH függése a tükörképe a vad típusú SqrF enzim pH függésének.

Összefoglalva az eredményeket elmondható tehát, hogy azonosítottuk a *T. roseopersicina* SqrF kinon kötőhelyét felépítő aminosavakat, melyek a Val331, Ile333 és Phe366. Ezek az aminosavak optimális helyzetben tartják a dUQ-t a megfelelő FAD-kinon elektrontranszfer megvalósulásához, amely feltehetően közvetlen a kofaktor és a ligand között. Az Ile333 lehetséges, hogy közvetett módon a szulfid oxidációra is hatással van. A C-terminális  $\alpha$ -hélix részt vesz a membránhoz való kötődésben, azonban nem esszenciális a szerepe, de közreműködik a dUQ optimális helyzetben való megkötésében. A konzervált Glu163 aminosavnak a *T. roseopersicina* SqrF katalitikus működés szulfid oxidációs lépésében van szerepe, mivel a szulfid-FAD elektrontranszfer folyamata nem megy végbe protontranszfer nélkül.

## 5. SUMMARY

The toxic sulfide plays various important physiological role in microorganisms and higher eukaryotes as electron and energy source or signaling molecule. SQR enzymes are ancient membrane-bound flavoproteins which are divided into six groups (SqrA-F or I-VI type SQRs). They play crucial role in the regulation of sulfide concentration, sulfide detoxification and maintenance of sulfide homeostasis. SQR enzymes catalyze a two-step redox process: sulfide oxidation and quinone reduction. It is known that conserved cysteines have role in the sulfide oxidation step, but other residues may have role in catalysis. The quinone reduction step is not well known.

*Thiocapsa roseopersicina* is a photosynthetic, anaerobic purple sulfur bacterium having an SqrF enzyme.

The aim of the presented studies was identification and functional characterization of amino acids and structural elements that participate in the catalysis of the redox reactions of SqrF enzyme in addition to cysteines. This enables a deeper understanding of catalytic mechanism of the evolutionarily and physiologically important SQR enzymes.

Glu163 is conserved in the vast majority of SQR proteins and located in the active centrum of these enzymes. Determining the function of this residue, various amino acid point mutants were constructed by site-directed mutagenesis (E163A, E163D, E163K, E163Q, E163S), purified and characterized. Biochemical and enzyme kinetic properties of these SqrF variants proved the role of this glutamic acid in the catalysis of sulfide oxidation. However, the Glu163 point mutant SqrF enzyme variants have an unusual, reduced quinone oxidizing activity in the presence of oxidized sulfur compounds.

The quinone binding site of *T. roseopersicina* SqrF was also studied. Some variants of the enzyme were constructed in which amino acids presumably involved in the quinone binding of SqrF (Val331, Ile333 and Phe366) were mutated to alanine and other aromatic residues. Structural model analysis and experimental results confirmed that the studied amino acids participate in the formation of the quinone binding pocket, determine the properties of interaction between the protein and quinone molecules and provide the optimal arrangement of the quinone molecules for electron transfer. Ile333 may have indirect role in sulfide oxidation step. It seems that FAD-quinone electron transfer took place directly. Analysis of a C-terminal  $\alpha$ -helix deletion mutant revealed that this region has role in membrane anchoring, but not essential for the catalysis.

## 6. A DOKTORI ÉRTEKEZÉS ÉS ELJÁRÁS ALAPJÁT KÉPEZŐ PUBLIKÁCIÓK

MTMT azonosító: 10064763

Összesített IF: 8,925

- I. **Nikolett Miklovics**, Ágnes Duzs, Fanni Balogh, Gábor Paragi, Gábor Rákhely és András Tóth. Quinone binding site in a type VI sulfide:quinone oxidoreductase, *Applied Microbiology and Biotechnology* (2022) 106:7505–7517, <https://doi.org/10.1007/s00253-022-12202-8>

IF: 5,46

- II. Ágnes Duzs\*, **Nikolett Miklovics\***, Gábor Paragi, Gábor Rákhely és András Tóth. Insights into the catalytic mechanism of type VI sulfide:quinone oxidoreductases, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics* 1862 (2021) 148337 <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2020.148337>

\*megosztott első szerző

IF: 3,465

## 7. EGYÉB KÖZLEMÉNYEK ÉS KONFERENCIA RÉSZVÉTELEK:

- III. **Miklovics Nikolett.** Egy új típusú szulfid kinon oxidoreduktáz katalitikus folyamatának vizsgálata.  
*XXIII. Tavaszi Szél Konferencia, 2020. október 16., online konferencia.*
- IV. Ágnes Duzs, **Nikolett Miklovics**, Tímea Balogh, Ildikó Dósa, Gábor Paragi, Gábor Rákhely, András Tóth.  
Unusual catalytic mechanism in a sulfide:quinone oxidoreductase.  
*Straub napok Konferencia, 2019. május 30-31., Szeged, Magyarország*
- V. **Miklovics Nikolett**, Duzs Ágnes, Dósa Ildikó, Rákhely Gábor, Tóth András.  
Novel sulfide oxidase enzyme candidating for biological treatment of sulfide contaminated water.  
*II. Sustainable Raw Materials Conference Book-International Project Week and Scientific Conference, május 6-10., Szeged, Magyarország: University of Szeged (2019) 312 p. pp. 212-215., 4p.*

- VI. **Miklovics Nikolett.** Egy VI. típusú szulfid kinon oxidoreduktáz enzim C-terminális kinon kötőhelyének funkcionális analízise.  
*XXII. Tavaszi Szél Konferencia, 2019. május 3-5., Debrecen, Magyarország*
- VII. **Miklovics Nikolett.** Szulfid oxidáció mechanizmusa egy VI. típusú szulfid kinon oxidoreduktáz enzimben.  
*XX. Tavaszi Szél Konferencia, 2017. március 31-április 2., Miskolc, Magyarország*
- VIII. **Miklovics Nikolett, Nyilasi Andrea, Rákhely Gábor.** Ecetsav hatása a *Thiocapsa roseopersicina* nitrogenáz enzimének hidrogén termelésére.  
*17. Kolozsvári Biológus Napok, 2016. március 15., Kolozsvár, Románia*
- IX. **Miklovics Nikolett,** Támavezetők: Tóth András, Rákhely Gábor. VI. típusú szulfid kinon oxidoreduktáz enzim működési mechanizmusának vizsgálata.  
*XXXIII. Országos Tudományos Diákköri Konferencia, 2017. április 9-12., Debrecen, Magyarország*
- X. **Miklovics Nikolett,** Támavezetők: Nyilasi Andrea, Rákhely Gábor. Nitrogenáz enzim hajtotta biohidrogén termelés ecetsav hozzáadásával *Thiocapsa roseopersicina*-ban.  
*XXXIII. Országos Tudományos Diákköri Konferencia, 2017. április 9-12., Debrecen, Magyarország*

## 8. POSZTEREK:

- XI. **Nikolett Miklovics, Ágnes Duzs, Gábor Paragi, Fanni Balogh, Gábor Rákhely, András Tóth.**  
Quinone-binding site of type VI sulfide:quinone oxidoreductases.  
*Straub napok Konferencia, 2022. május 25-27., Szeged, Magyarország*
- XII. **Nikolett Miklovics, Ildikó Dósa, Ágnes Duzs, Gábor Rákhely, András Tóth.**  
Role of a conserved glutamic acid in the catalytic mechanism of type VI sulfide:quinone oxidoreductases.  
*Straub napok Konferencia, 2019. május 30-31., Szeged, Magyarország*

- XIII. Barbara Gubán, Renáta Bozó, Judit Danis, **Nikolett Miklovics**, Balázs Koncz, Róbert Kui, István Németh, Attila Bebes, Márta Széll, Lajos Kemény, Zsuzsanna Bata-Csörgő. Abnormal type VII collagen protein expression in non-lesional psoriatic skin.  
*Magyar Immunológiai Társaság 47. Vándorgyűlése, 2018. október 17-19., Bükkfűrdő, Magyarország*
- XIV. Ágnes Duzs, **Nikolett Miklovics**, Fanni Balogh, Brigitta Németh, Gábor Rákhely, András Tóth.  
Functional analysis of type VI sulfide:quinone oxidoreductase in photosynthetic purple sulfur bacterium.  
*The 43<sup>rd</sup> FEBS Congress, 2018. július 7-12., Prága, Csehország*
- XV. Tóth András, Duzs Ágnes, **Miklovics Nikolett**, Balogh Fanni, Németh Brigitta, Rákhely Gábor.  
Insights into the mechanism of type VI sulfide:quinone oxidoreductases.  
*5<sup>th</sup> International Symposium on Microbial Sulfur Metabolism Conference, 2018. április 16-18., Bécs, Ausztria*
- XVI. **Nikolett Miklovics**. Abnormal basal membrane protein expression in non-lesional psoriatic skin.  
*Magyar Immunológiai Társaság 46. Vándorgyűlése, 2017. október 18-20., Velence, Magyarország*
- XVII. **Nikolett Miklovics**, Ágnes Duzs, Fanni Balogh, Gábor Rákhely, András Tóth.  
Catalytic mechanism of a novel sulfide:quinone oxidoreductase.  
*Straub napok Konferencia, 2017. május 24-25., Szeged, Magyarország*
- XVIII. Fanni Balogh, Ágnes Duzs, **Nikolett Miklovics**, Gábor Paragi, Gábor Rákhely, András Tóth.  
Functional characterization of C-terminal domain in a sulfide:quinone oxidoreductase.  
*Straub napok Konferencia, 2017. május 24-25., Szeged, Magyarország*



XIX. **Nikolett Miklovics**, Ágnes Duzs, Levente Ivanov, Gábor Paragi, Gábor Rákhely, András Tóth.

Characterization of catalytic mechanism of a sulfide:quinone oxidoreductase enzyme.

*Straub napok Konferencia, 2016. május 25-26., Szeged, Magyarország*

XX. **Nikolett Miklovics**, Andrea Nyilasi, Kornél L. Kovács, Gábor Rákhely.

Effect of acetic acid on nitrogenase catalysed biohydrogen production in *Thiocapsa roseopersicina*.

*Straub napok Konferencia, 2016. május 25-26., Szeged, Magyarország*

## Társszerzői nyilatkozat

Kijelentem, hogy ismerem Miklovics Nikolett PhD fokozatra pályázó doktorjelölt „A VI. típusú szulfid kinon oxidoreduktáz működési analízise” című disszertációját. Felelős szerzőként kijelentem, hogy Miklovics Nikolett jelentősen hozzájárult az alább felsorolt, a doktori eljárás alapjául szolgáló tudományos publikáció eredményéhez:

**Nikolett Miklovics**, Ágnes Duzs, Fanni Balogh, Gábor Paragi, Gábor Rákhely és András Tóth. Quinone binding site in a type VI sulfide:quinone oxidoreductase, *Applied Microbiology and Biotechnology* (2022) 106:7505–7517, <https://doi.org/10.1007/s00253-022-12202-8> IF: 5,46

Ágnes Duzs\*, **Nikolett Miklovics\***, Gábor Paragi, Gábor Rákhely és András Tóth. Insights into the catalytic mechanism of type VI sulfide:quinone oxidoreductases, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics* 1862 (2021) 148337, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2020.148337> IF: 3,465

\*megosztott első szerző

Igazolom továbbá, hogy az ebben a dolgozatban bemutatott eredményeket egyetlen más PhD dolgozat sem mutatta be és a jövőben sem használják fel tudományos fokozat megszerzéséhez.

Szeged, 2023.08.28.

.....  
Dr. Rákhely Gábor

.....  
Dr. Tóth András

.....  
Dr. Duzs Ágnes

.....  
Dr. Paragi Gábor

.....  
Balogh Fanni