

# A VI. típusú szulfid kinon oxidoreduktáz működési analízise

Ph.D. értekezés

**Miklovics Nikolett**

Témavezetők:

Dr. Rákhely Gábor

Dr. Tóth András

Szegedi Tudományegyetem

Biológia Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem, Biotechnológiai Tanszék

Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Biofizikai Intézet

SZTE TTIK

2023

Szeged



# Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	1
<b>1. Bevezetés.....</b>	<b>3</b>
1.1 A kén és a szulfid előfordulása, szerepe és toxicitása.....	4
1.2 A szulfid oxidációját katalizáló enzimek.....	6
1.3 Flavocitokróm c fehérjék.....	8
1.4 Szulfid kinon oxidoreduktáz enzimek.....	9
1.4.1 SQR fehérjék különböző típusai.....	10
1.4.2 SQR fehérjék termeltetése.....	13
1.4.3 SQR fehérjék szerkezeti jellemzői.....	14
1.4.4 Az SQR enzimek által katalizált reakciók főbb lépései.....	15
1.4.4.1 A szulfid bejutása az SQR aktív centrumába, a fehérje FAD kofaktor kötése.....	16
1.4.4.2 A katalízis szulfid oxidációs lépése és a konzervált ciszteinek szerepe.....	17
1.4.4.3 SQR fehérjék C-terminális doménje.....	23
1.4.4.4 Az SQR enzimek kinon kötőhelye.....	25
1.5 <i>Thiocapsa roseopersicina</i> BBS, a modellorganizmus.....	27
1.5.1 A <i>T. roseopersicina</i> szulfid oxidáló enzimjei.....	28
<b>2. Célkitűzések.....</b>	<b>32</b>
<b>3. Anyagok és módszerek.....</b>	<b>33</b>
3.1 Felhasznált baktériumok tenyésztése.....	33
3.1.1 <i>Escherichia coli</i> törzsek növesztési körülményei.....	33
3.1.2 Tenyésztési körülmények <i>T. roseopersicina</i> törzsekhez.....	33
3.2 Baktériumok transzformálása.....	34
3.2.1 Kompetens <i>E. coli</i> sejtek készítése.....	34
3.2.2 <i>E. coli</i> sejtek transzformálása.....	34
3.2.3 A <i>T. roseopersicina</i> sejtek konjugálása.....	35
3.3 DNS módosítással kapcsolatos technikák.....	36
3.3.1 Plazmid DNS tisztítása <i>E. coli</i> sejtekből.....	36
3.3.2 Agaróz gélelektroforézis.....	36
3.3.3 Polimeráz láncreakciók.....	37
3.3.4 DNS végek módosítási eljárásai.....	37

3.3.5	Ligálás.....	37
3.3.6	DNS fragmentum izolálás.....	37
3.3.7	Nukleotidsorrend meghatározása.....	38
3.3.8	Helyspecifikus mutagenézis.....	38
3.3.9	Pontmutáns SqrF fehérjék termelését biztosító expressziós vektorok előállítása .....	39
3.4	Fehérjetermeltetés és tisztítás .....	40
3.4.1	Vad típusú és mutáns SqrF fehérjét termelő <i>T. roseopersicina</i> sejtmembrán frakció előállítása.....	40
3.4.2	Az izolált sejtmembránból történő fehérjefelszabadítás nátrium-bromid kezeléssel .....	41
3.4.3	SqrF fehérje tisztítás affinitás kromatográfiás módszerrel.....	41
3.5	Fehérjeanalitikai módszerek .....	42
3.5.1	Fehérje mennyiségének meghatározása Micro-Lowry módszerrel.....	42
3.5.2	Denaturáló poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE).....	42
3.5.3	Western-blot hibridizáció.....	43
3.5.4	Fehérje abszorpciós spektrumának meghatározása.....	44
3.5.5	A tisztított enzimek szulfid függő kinon redukáló aktivitásának mérése.....	44
3.5.6	Vad típusú és tisztított SqrF enzimvariánsok kinetikai paramétereinek meghatározása.....	45
3.5.7	Vad típusú és mutációt hordozó SqrF enzimek aktivációs energiájának meghatározása.....	45
3.5.8	A tisztított vad típusú és mutáns SqrF enzimvariánsok redox állapotának megváltoztatása .....	46
3.6	Bioinformatikai analízis.....	46
3.6.1	A <i>T. roseopersicina</i> SqrF homológia modellje .....	46
3.6.2	Protein-ligand kölcsönhatás <i>in silico</i> molekuladinamikai analízise.....	47
3.6.3	Statisztikai számítások.....	47
<b>4.</b>	<b>Eredmények .....</b>	<b>48</b>
4.1	A <i>T. roseopersicina</i> SqrF fehérje kinon kötőhelyének azonosítása és szerepe a katalízisben .....	48
4.1.1	A vad típusú <i>T. roseopersicina</i> SqrF kinon kötőhelyének analízise .....	48
4.1.1.1	A <i>T. roseopersicina</i> SqrF fehérje kinon kötőhelyének meghatározása.....	48
4.1.1.2	A <i>T. roseopersicina</i> SqrF és a dUQ szubsztrát közötti kölcsönhatás <i>in silico</i> vizsgálata.....	50
4.1.2	Az SqrF F366A enzimvariáns szerkezeti analízise <i>in silico</i> molekuladinamikai módszerekkel.....	54
4.1.3	A <i>T. roseopersicina</i> SqrF kinon kötőhelyét alkotó aminosavak funkciója .....	57
4.1.3.1	Kinon kötőhely és C-terminális $\alpha$ -hélix mutáns <i>T. roseopersicina</i> SqrF változatokat termelő <i>T. roseopersicina</i> törzsek létrehozása .....	57

4.1.3.2	Kinon kötőhely és C-terminális $\alpha$ -hélix mutáns <i>T. roseopersicina</i> SqrF variánsok termeltetése és tisztítása .....	59
4.1.3.3	Kinon kötőhely és CTD mutáns SqrF változatok spektroszkópiai analízise .....	61
4.1.3.4	A tisztított kinon kötőhely és CTD mutáns SqrF fehérjék szulfid-függő kinon redukáló aktivitása	64
4.1.3.5	Kinon kötőhely és C-terminális $\alpha$ -hélix mutáns SqrF enzimek kinetikai paramétereinek meghatározása.....	65
4.1.3.6	Kinon kötőhely és C-terminális $\alpha$ -hélix mutáns SqrF enzimek aktivitásának hőmérséklet függése, aktiválási energiái .....	67
4.1.3.7	A C-terminális $\alpha$ -hélix mutáns SqrF enzim hőstabilitása .....	68
4.2	<i>T. roseopersicina</i> SqrF Glu163 enzimműködésben játszott szerepének feltérképezése .....	69
4.2.1	A Glu163 mutáns <i>T. roseopersicina</i> SqrF enzimvariánsokat termelő törzsek létrehozása .....	69
4.2.2	A Glu163 mutáns SqrF fehérjék termeltetése és tisztítása .....	70
4.2.3	Glu163 mutáns <i>T. roseopersicina</i> SqrF változatok spektroszkópiai analízise .....	73
4.2.3.1	Az SqrF E163A mutáns fehérjék redukálhatósága .....	74
4.2.4	A Glu163 variáns SqrF fehérjék szulfid-függő kinon redukáló aktivitása.....	75
4.2.4.1	A Glu163 mutáns SqrF enzimek katalitikus aktivitásának függése az enzimkoncentrációtól	76
4.2.4.2	Az SqrF E163A enzimvariáns katalitikus aktivitásának kinon koncentrációtól való függése	78
4.2.4.3	Az SqrF E163A variáns katalitikus aktivitásának pH- függése.....	79
<b>5.</b>	<b>Diszkusszió .....</b>	<b>80</b>
5.1	A <i>T. roseopersicina</i> SqrF enzim kinon kötőhelyének azonosítása .....	80
5.2	A <i>T. roseopersicina</i> SqrF kinon kötőhely szerepe a katalitikus folyamatban .....	83
5.3	A Glu163 konzervált aminosav szerepének vizsgálata <i>T. roseopersicina</i> SqrF enzimben .....	87
<b>6.</b>	<b>Köszönetnyilvánítás.....</b>	<b>90</b>
<b>7.</b>	<b>Irodalomjegyzék .....</b>	<b>91</b>
<b>8.</b>	<b>Összefoglalás .....</b>	<b>103</b>
<b>9.</b>	<b>Summary .....</b>	<b>107</b>
<b>10.</b>	<b>Függelék.....</b>	<b>111</b>
10.1	Felhasznált baktérium törzsek.....	111
10.2	Felhasznált plazmidok felsorolása .....	112
10.3	Felhasznált oligonukleotidok és szekvenciáik .....	115
10.4	A munka során előforduló kinonok szerkezete .....	116

## Rövidítések jegyzéke

3H8L: *Acidianus ambivalens* SqrE kristályszerkezetének Protein Adatbázis azonosítója

3HYW: *Aquifex aeolicus* SqrA kristályszerkezetének Protein Adatbázis azonosítója

3HYV: *Acidithiobacillus ferrooxidans* SqrA SqrA kristályszerkezetének Protein Adatbázis azonosítója

Amp: ampicillin

CTC: töltés transzfer komplex

DMSO: dimetil-szulfoxid

dNTP: dezinukleozid-trifoszfát

DQ: durokinon

DSR: diszulfid reduktáz enzimes család

dUQ: decilubikinon

EDTA: etilén-diamin-tetraecetsav

FCC: flavocitokróm c fehérje

FccA: flavocitokróm c fehérje kis alegysége

FccB: flavocitokróm c fehérje nagy alegysége

FDR: flavoprotein diszulfid reduktáz enzimes család

Gm: gentamicin

HABA: hidroxil-azofenil-benzoidsav

$k_{cat}$ : az enzim katalitikus sebesség állandója

$k_{cat}/K_m$ : az enzim kinon redukáló aktivitásának katalitikus hatékonysága

$K_m$ : Michaelis-Menten konstans, az enzim affinitása a szubsztráthoz

Km: kanamicin

LB: Luria-Bertani tápoldat

NDH-2: II. típusú NADH:kinon oxidoreduktáz

OD: optikai denzitás

PBS: foszfáttal pufferelt sóoldat

PBS-T: PBS Tween 20-szal kiegészítve

PC: Pfennig-féle tápoldat

PCA: standard számláló agar

PCR: polimeráz láncreakció

PDB: Protein Adatbázis

PDB ID: Protein Adatbázis azonosító

REMD/REST: Replika-csere molekuladinamika (Replica-Exchange with Solute Tempering)

SDS: nátrium-dodecil-szulfát

SDS-PAGE: denaturáló poliakrilamid gélelektroforézis

SE: standard hiba

Sm: sztreptomycin

SOB: super optimal broth (tápanyagokban gazdag tápoldat)

SOC: glükózzal kiegészített tápanyagokban gazdag tápoldat (super optimal broth with catabolite repression)

SQR: szulfid kinon oxidoredukáz

TAE: Tris-acetát-EDTA tápoldat

TB: magas szénforrás tartalmú gazdag tápoldatban (Terrific Broth)

TBS: Tris-sel pufferelt sóoldat

TBSSL: TBS szacharózzal és lizozimmal kiegészítve

Tc: tetraciklin

tDBDF: két dinukleotid kötő doménnel rendelkező flavoprotein szupercsalád

TEMED: N,N,N',N'-tetrametil-etilén-1,2-diamin

TGS: Tris-glicin-SDS puffer

TRIS: Tris-(hidroximetil)-aminometán

UC: ultracentrifuga

## 1. Bevezetés

A kén a sejtek számára esszenciális elem, redukciója során szulfid keletkezik, amely a legredukáltabb formája. A szulfid bizonyos koncentráció felett gátolja a légzési lánc utolsó, IV. komplexét, a citokróm oxidázt, melynek feladata az oxigén vízzé redukálása, protonpumpa aktivitása mellett. Ennek ellenére a prokarióta és az eukarióta élőlényekben is számos fiziológias folyamatért felel, metabolikus útvonalaiiban fontos szerepet tölt be. Számos mikroorganizmus számára elsődleges elektrononorként funkcionál. Soksejtes szervezetekben a jelátvitelben is részt vesz a szulfid. Emlősökben kiemelkedő szerepe van többek között a központi idegrendszerben és a kardiovaszkuláris szabályozásban. Szignálmolekula funkciója és a nagy koncentrációja esetén fellépő toxicitása miatt szükséges a sejtes és szöveti szulfid szint szabályozása, illetve a szulfid detoxifikálás. Ez elsősorban a szulfid hatékony átalakításával, oxidált állapotú kénformákká alakításával valósítható meg. Ebben elsődlegesen a szulfid oxidáló enzimeknek van szerepük. Ide tartoznak az ősi diszulfid oxidoreduktáz fehérjecsald flavoproteinjei, a flavocitokróm c szulfid dehidrogenázok (FCC) és a szulfid kinon oxidoreduktáz (SQR) enzimek. Jelentőségüket mutatja, hogy már az evolúció korai szakaszában kialakultak és az élővilág széles körében elterjedtek. A membránkötött SQR fehérjék minden élőlényben megtalálhatóak, kivéve a növényeket. Szerkezetüket tekintve nagyon konzerváltak. Filogenetikai kapcsolataik, szekvencia motívumaik és a konzervált aminosavaik mintázata alapján hat csoportba sorolhatók (Sqr I-VI. vagy SqrA-F). Közös jellemzőjük, hogy az aktív centrumukban FAD kofaktor helyezkedik el, valamint konzervált pozícióban ciszteinek találhatóak bennük. A konzervált ciszteinek számában és mintázatában azonban az egyes enzimszoportok eltérhetnek. Az SQR enzimek a szulfid és kinon molekulák közti elektrontranszfert katalizálják, amely során egy két lépésből álló redoxreakció játszódik le. Az első a redukív fázis, amelyben az enzim megköti a szulfidot és oxidációja során elektronok kerülnek a FAD kofaktorra az esszenciális ciszteinek részvételével. Ezt követi az oxidatív fázis, amikor az elektronok a kofaktorról ubikinon vagy menakinon vegyületeknek adódnak át, amivel újra oxidált állapotba kerül a fehérje.

A VI. típusú Sqr enzimekről kevés információ áll rendelkezésre. Szerkezetét tekintve több ponton eltér a többi SQR-tól, ezért megismerésük számos új információval szolgálhat. Kutatócsoportunk egy tipikus képviselőjüket, a *Thiocapsa roseopersicina* SqrF enzimet vizsgálta. Biokémiai és spektroszkópai módszerekkel jellemeztük a fehérjét, amelyet a vizsgálatokhoz homológ rekombináns módon *T. roseopersicina* sejtekben termeltettünk meg és affinitás kromatográfiával tisztítottunk. Pontmutáns SqrF enzimek vizsgálatára alapozva

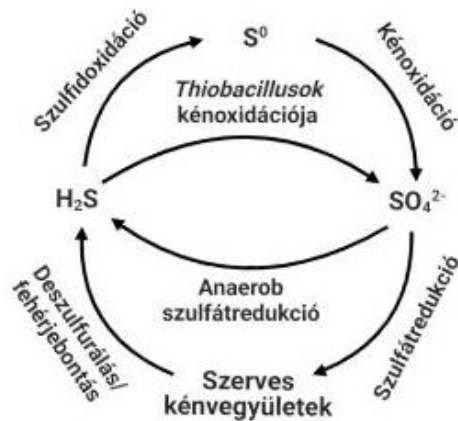
meghatároztuk a konzervált ciszteinek szerepét a szulfid oxidációs lépésében, és felállítottuk a katalitikus folyamat modelljét. Mind kinetikai paramétereiben, mind katalitikus működésében különbözik a többi vizsgált SQR fehérjétől. Munkám egyik célja a redukív fázisban közreműködő, az összes SQR-ben konzervált pozícióban megtalálható glutaminsav szerepének meghatározása. Továbbá, az SqrF kinon redukciójához szükséges katalitikus hely meghatározása, és a kinon szubsztrát molekulák aktív centrumba jutását biztosító csatornát kialakító aminosavak azonosítása és szerepük felderítése.

### 1.1 A kén és a szulfid előfordulása, szerepe és toxicitása

A kén az élet egyik legsokoldalúbb eleme. Nyolc atomos, egymással kovalens kötéssel kapcsolódó molekulagyűrűt alkot. A kén oxidációs állapotainak száma -2 (szulfid) és +6 (szulfát) között változhat. Ez lehetővé teszi, hogy a vegyületei részt vehessenek különböző redoxreakciókban elektrondonorként vagy akceptorként. A kén a legnagyobb számú, mintegy 30 allotróppal rendelkezik, azonban közülük csak néhány található meg a természetben. A kén elemi formában elsősorban gyógyvizekben, vulkángőzökben fordul elő (Barton és mtsai. 2014). Szulfid formájában a természetben vulkáni gázokban, földalatti víztározókban, kénes ásványvizekben, geotermikus forrásokban, mélytengeri hidrotermális kürtök környezetében található meg (Lloyd 2006). A ként textil- és papíriparban fehérítőként alkalmazzák, valamint a gumi-, gyufagyártásban, lőpor és gyógyszerek előállításában is hasznosítják, de növényvédőszerként is alkalmazható.

A mikrobiális kénkörforgalom során a természetben elemi kénből kemo- és/vagy fototróf mikroorganizmusok (pl. *Chromatiaceae*, *Thiospirillum*) kénoxidációval szulfátot állíthatnak elő. Ez történhet aerob és anaerob módon is (Lloyd 2006). A szulfátból aerob szulfátredukció során a kén szerves kötésben épül be a biomassza szerves sejtalkotóiba és szulfid is képződhet, anaerob körülmények között pedig a szulfát elektrónakceptorként szolgál az anaerob légzésben (pl. *Desulfovibrio*, *Desulfolobus*) (Barton és mtsai. 2014). Anaerob szulfátlégzés folyamata során szulfátból közvetlenül hidrogén-szulfid képződik (**1. ábra**). Anaerob körülmények között jellemzőbb a szulfát redukció és a disszimilációs szulfát termelés. A szulfátredukcióval keletkező szerves kénvegyületekből deszulfurálás/fehérjebontás során szintén kén-hidrogén ( $H_2S$ ) szabadul fel. A  $H_2S$ -ből kemo- és fototróf mikroorganizmusok aerob és anaerob módon a szulfid oxidációjával elemi ként állítanak elő, ami ismét szulfáttá oxidálódik, ez zárja a kört. A *Thiobacillusok* képesek egy lépésben a hidrogén-szulfidot kénoxidációval szulfáttá alakítani (**1. ábra**) (Cron és mtsai. 2019; Xia és mtsai. 2017).





1. ábra: A kén mikrobiális körforgalma

Az élővilágban különböző biológiai folyamatok esszenciális molekulája a kén, beleértve a metionin, cisztein, glutation szintézist, amelyek a sejtek növekedésében kulcsszerepet töltenek be, továbbá a lipidek, metabolitok nélkülözhetetlen eleme (Lü és mtsai. 2017; Clarke 1953). A kén fontos szerepet játszik az oxidatív és nehézfém stressz leküzdésében, például *Saccharomyces cerevisiae*-ben (Ohtsuka és mtsai. 2021).

A szulfid a kén legredukáltabb formája a biogeokémiai ciklusban, valamint az egyetlen termodinamikailag stabil hidridje (Lü és mtsai. 2017). A  $H_2S$  színtelen, kellemetlen, záptojás szagú, toxikus vegyület. A kén körforgása során számos mikroorganizmus képes  $H_2S$  előállítására. Eukarióta sejtekben elsődlegesen a cisztein lebontási folyamata során képződik négy enzim közreműködésével: cisztein- $\beta$ -szintáz, cisztein- $\gamma$ -liáz, cisztein-aminotranszferáz és 3-merkaptopiruvát szulfurtranszferáz (Olas 2016).

A toxikus koncentrációjú szulfid a légzési lánc IV. komplexének, a citokróm c oxidáz enzim gátlásán keresztül fejt ki hatását a prokariótáktól az eukariótákig (Nicholls 1975). A toxikus mennyiségű  $H_2S$  a cianobaktériumokban a PSII fotokémiai rendszert gátolja (Arieli és mtsai. 1989). A szulfid a humán szervezetben az ér-, szív- és idegrendszerre hat negatívan, nagyon nagy mennyiségben a légzés leállításához vezet (Hildebrandt és Grieshaber 2008; Wang 2002). A sejtekben a  $H_2S$  a hem-csoportokat tartalmazó enzimek vas atomjaihoz kapcsolódva gátolja többek között a citokróm c-t és leállítja a sejtlegzést, valamint reaktív gyököket képez (Reiffenstein és mtsai. 1992). Ezen felül néhány betegség kialakulásában is szerepet játszhat humán szervezetben, ilyen például a tüdőödéma (Prior és mtsai. 1990), fekélyes vastagbélgyulladás (Roediger és mtsai. 1997), valamint neurodegeneratív betegségek (Down- és Alzheimer-kór) (Kimura 2002).

A  $H_2S$  egy kétarcú molekula, toxicitása ellenére alacsony koncentrációban egy alapvető és kulcsfontosságú vegyület mind az aerob mind az anaerob organizmusok számára (Jackson

és mtsai. 2015). Számos prokariótában (főként foto- és kemolitotróf baktériumok) elektront biztosít az elektrontranszport számára (Barton és mtsai. 2014; Friedrich és mtsai. 2001). Az Archaea doménen belül több rendben azonosítottak szulfid oxidáló mikroorganizmusokat. A további szulfid oxidálók a Baktérium doménbe tartoznak, azon belül is az  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\epsilon$ -*Proteobaktérium*-ok, *Chlorobium*-ok és *Chloroflexotá*-k osztályába (Luo és mtsai. 2013; Friedrich és mtsai. 2005). Az aerob kemotróf szintelen baktériumok, például a *Thiobacillus*, *Beggiatoa*, *Halothiobacillus* képesek a szulfidot oxigén jelenlétében energetikailag hasznosítani. Az anaerob fototrófok, mint a zöld kénbaktériumok (pl. *Chlorobium*) vagy a bíbor kénbaktériumok (pl. *Halochromatium*) a fény és a szulfid elektronjainak felhasználásával nyernek kémiai energiát (Ghosh és Dam 2009). A nem fototróf obligát anaerob *Wolinella succinogenes* a szulfid oxidációja során fumarátot használ elektronakceptorként (Macy és mtsai. 1986). Az eukarióták között a gerinctelen Vestifera rendbe tartozó csőférgek a hidrotermikus kúrtók környékén élnek szimbiózisban kemolitotróf szulfid-oxidáló és a metán-oxidáló baktériumokkal és felhasználják a szulfidot (Cavanaugh 1983). A szulfidot felhasználó organizmusok a szulfid oxidációja során elemi ként állítanak elő, amelyet sejtjeikben energiaraktárként felhalmozhatnak. Élesztőkben a sejt növekedésében és az osztódásban is szerepet játszik (Lloyd 2006). Soksejtes szervezetekben jelátviteli funkciót is ellát. A szén-monoxidhoz és nitrogén-monoxidhoz hasonlóan a szulfid is gazotranszmitter, vagyis endogén gáz halmazállapotú ingerületátvivő anyag (Wang 2002). Emlősökben számos biológiai folyamatban részt vesz: vaszkuláris tónus szabályozás a simaizomban és a szívben a kálium csatornák aktiválásával, inflammáció, nocicepció, citoprotektív (Lloyd 2006; Zhao 2001). A szulfid az egyetlen szerves anyag, amelyből alacsony koncentrációban - mint mitokondriális elektrondonorból - az emlős mitokondrium ATP-t képes előállítani az oxidatív szulfidhasznosítás során, melyben a szulfid-kinon reduktáz enzimeknek van kiemelkedő szerepe. A folyamat eredményeként szulfát vagy tioszulfát képződik és ez elraktározódik vagy disszimilálódik (Szabo és mtsai. 2013).

## 1.2 A szulfid oxidációját katalizáló enzimek

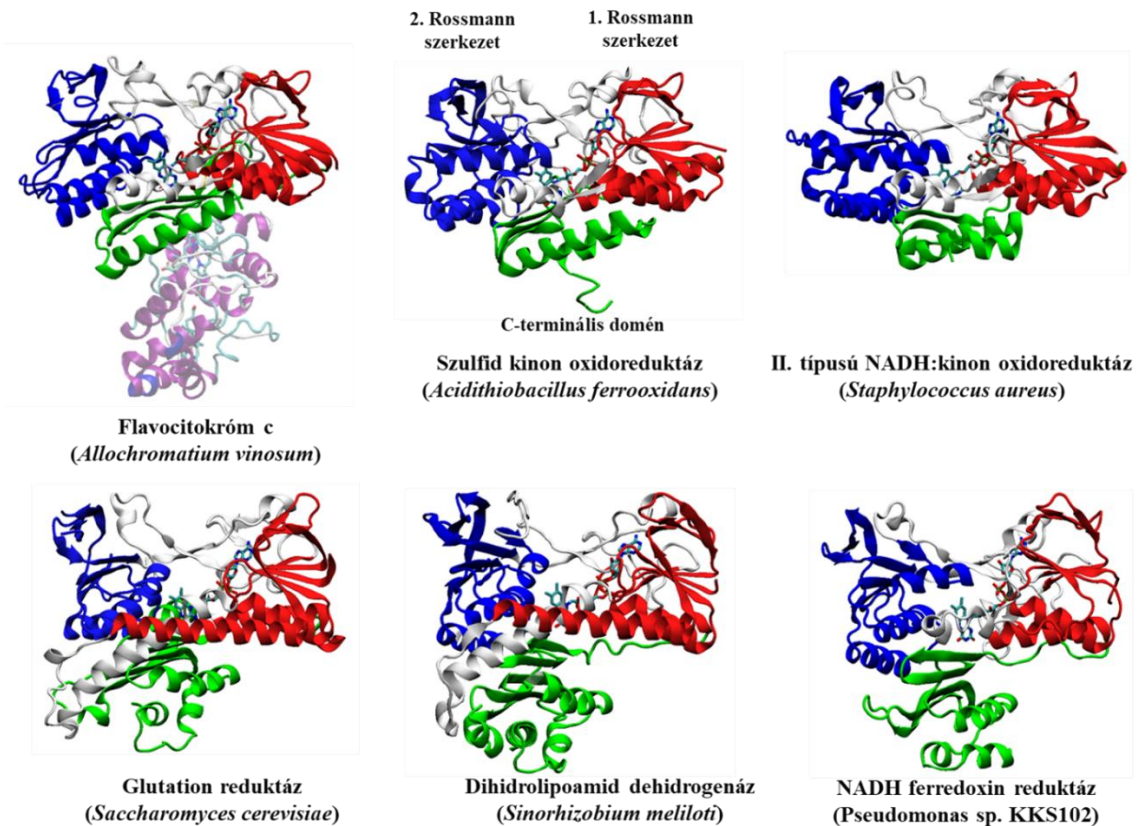
A szulfid oxidációjának a szulfid szintjének szabályozásában, a detoxifikálásban, a homeosztázis fenntartásában, elektrondonorként való hasznosításában van kiemelkedő szerepe. Ezt a reakciót a szulfid oxidáló enzimek katalizálják. A flavocitokróm c szulfid dehidrogenáz (FCC) és a szulfid kinon oxidoreduktáz (SQR) enzimek szulfid oxidáló aktivitással rendelkeznek és a flavoprotein diszulfid reduktáz (FDR) enzimesaládba tartoznak (Cherney és mtsai. 2010). Rajtuk kívül ide tartoznak még például a perszulfid dioxigenáz, a koenzim A

perszulfid reduktáz, valamint a rodanáz vagy tioszulfáttiotranszferáz enzimek (Walsh és mtsai. 2020). A szulfid oxidáló enzimek nagyon ősiek, feltehetően az élet kezdetén, már az anaerob világban megjelentek. Széles körben elterjedtek, a baktériumoktól az emlősökig megtalálhatóak (Shahak és Hauska 2008).

Az FCC és SQR enzimek közös jellemzője, hogy a két dinukleotid kötő doménnel rendelkező flavoprotein szupercsalád (tDBDF) tagjai és FAD kofaktorról rendelkeznek. A tDBDF szupercsaládba több, mint 1600 redox enzim tartozik, melyek különböző funkciót látnak el, például a II. típusú NAD(P)H-kinon-oxidoreduktáz, glutation reduktáz, dihidropoliamid dehidrogenáz és ferredoxin reduktáz enzimek (Marreiros és mtsai. 2016; Ojha és mtsai. 2007). Minden tDBDF fehérje három konzervált doménnel rendelkezik (**2. ábra**). Két Rossmann-fold szerkezet található bennük, valamint egy rövidebb C-terminális domén. Ezek a domének  $\beta$ -lemezekből és  $\alpha$ -hélixekből épülnek fel (Hanukoglu 2015). A Rossmann-fold szerkezet a fehérjékben előforduló harmadlagos szerkezet, amelynek az enzimekben az elsődleges szerepe a kofaktor kötés és gyakran a szubsztrát kötéshez is hozzájárulnak. Mindegyik domén jelen van az összes családban a szupercsaládon belül és szükségesek ahhoz, hogy a fehérjék betöltsék funkciójukat. A tDBDF tagjainak dinukleotid kötő motívumai a GxGxxG/A, további jellegzetes konzervált motívumaik: ATG, GxxP, GD, HRRXXXR (Ojha és mtsai. 2007).

A tDBDF szupercsalád tagjaiban az első Rossmann-fold szerkezet a kapcsolódó kofaktort, a FAD-ot köti meg. A második Rossmann-fold domén piridin nukleotid kötéséért felel, kivéve az FCC típusú enzimeket, ahol a piridin nukleotidot hidrogén-szulfid helyettesíti (Ojha és mtsai. 2007). A második Rossmann-foldhoz a piridin nukleotid átmenetileg kötődik, majd a redoxreakciót követően leválik (**1. ábra**). Azonban az FCC és SQR típusú fehérjék egy jellegzetes kulcsmotívuma, az ún. „sapka” hurok csökkenti a fehérje centrumába vezető csatorna méretét, ezáltal nem tud a NAD vagy más redukált szerves molekula kötődni a második Rossmann-fold szerkezetéhez, csak a szulfid tud bejutni az aktív centrumba (Sousa és mtsai. 2018). A tDBDF szupercsalád enzimeiben a harmadik konzervált szerkezeti elem, a C-terminális domén, melynek hossza a szupercsaládon belül változatos, illetve van, ahol nincs jelen. A katalízisben, az elektron akceptor kinon szubsztrát kötésben az ezen a régió elhelyezkedő konzervált ciszteinek, hisztidinek, glutamátok töltenek be kiemelkedő szerepet a szupercsaládon belül (Ojha és mtsai. 2007). A C-terminális domén konformációs flexibilitást jelent a fehérje számára (Hammerstad és Hersleth 2021). Ez a régió szerepet játszhat a szupercsalád különböző enzimeinek eltérő működésében (Seo és Asano 2018). A C-terminális domén a fehérje oligomerizációjáért is felelős lehet (Hammerstad és Hersleth 2021), valamint

a membránhoz való kapcsolódásban is részt vehet a szupercsalád membránkött tagjai között (Lencina és mtsai. 2013; Marcia és mtsai. 2009).



**2. ábra:** A két dinukleotidot kötő doménnel rendelkező flavoprotein szupercsalád (tDBDF) redox fehérjéi, jelölve a három konzervált domént. Pirossal az első Rossmann-fold szerkezet, késsel a második Rossmann-fold szerkezet és zölddel a C-terminális domén került kiemelésre

### 1.3 Flavocitokrom c fehérjék

Az FCC fehérjék több zöld és bíbor baktériumban is megtalálhatók, például számos *Chlorobium* fajban, *Chromatium tepidum*-ban és *Thiocapsa roseopersicina*-ban is. Először *Allochromatium vinosum* fototróf bíbor kénbaktériumban azonosították (Kostanjevecki és mtsai. 2000). Továbbá kemolitotróf kén-oxidáló baktériumokban is megtalálható (Lü és mtsai. 2017). Az FCC egy szolúbilis, periplazmatikus enzim (Griesbeck és mtsai. 2000). Azonban egy nem fototróf aerob baktériumban, az egyik *Thiobacillus* fajban, az *Ectothiorhodospira vacuolata*-ban felfedezték egy membránkött változatát (Kostanjevecki és mtsai. 2000). Az FCC jelenléte az adott baktériumban szulfid-tartalmú ökoszisztémához kötött (Sousa és mtsai. 2018). Két alegységből áll, melyek nem kovalensen kötődve alkotnak heterodimert (**2. ábra**). A nagyobb kb. 45-47 kDa molekulatömegű alegység (FccB) flavin csoportot tartalmaz, és köti a szulfidot. A kisebb alegység (FccA), ha egy hem csoportot köt, akkor 10 kDa molekulásúlyú, mint például a *Chlorobium limicola* FCC. Míg az *A. vinosum* FCC esetén az FccA citokrom c

alegység nagyobb, kb. 21 kDa, ugyanis két hem csoportot tartalmaz (Tikhonova és mtsai. 2021; Reinartz és mtsai. 1998; Brune 1995). Az FCC fehérje szignál szekvenciával rendelkezik, ami alátámasztja a periplazmatikus elhelyezkedést (Kostanjevecki és mtsai. 2000). Az FCC képes hasznosítani a szulfidot, mint elektrondonort és elemi ként állít elő belőle (Kostanjevecki és mtsai. 2000; Chen és mtsai. 1994). Oxidációja során az elektronok c-típusú citokróm fehérjékre jutnak, majd innen a membrán kinon raktárába kerülnek (Barton és mtsai. 2014).

#### **1.4 Szulfid kinon oxidoreduktáz enzimek**

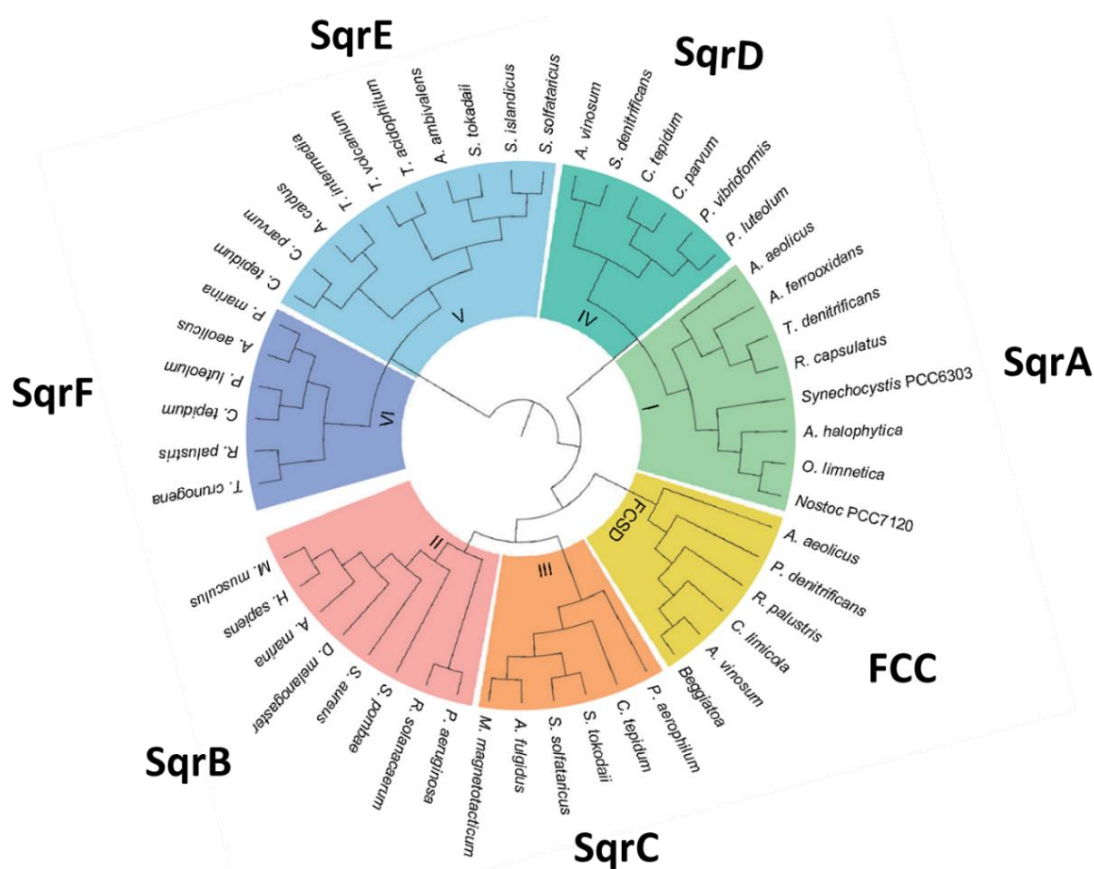
Az SQR fehérjék megtalálhatóak az Archaea-kban, baktériumokban, gombákban, rovarokban és gerincesekben, azonban növényekben, az állatokon belül a tüskésbőrűekben és a gombákon belül a mikrospórásokban, valamint *S. cerevisiae* élesztőben nem azonosították őket (Sousa és mtsai. 2018; Shahak és Hauska 2008). A szulfid oxidációjának katalízise révén számos fiziológiai folyamatban töltenek be szerepet, többek között a szulfid detoxifikációban vagy az anaerob fotoszintézisben. A baktériumokban és az élesztőkben a sejtek nehézfém toleranciáját növelik (Vande Weghe és mtsai. 1999), magasabb rendű élőlényekben pedig a szulfid homeosztázis fenntartásáért felelnek (Wang 2010). Ezen keresztül emlősökben szerepük van a simaizom relaxáció folyamatában, amiből következik, hogy sokféle élettani folyamatban és szerv működésében töltenek be szerepet (Szabo 2016). Emiatt az SQR enzimek patofiziológiai folyamatokban is szerepet játszanak, például a karcinogenezisben vagy neurodegeneratív betegségekben (Zhang és mtsai. 2021).

Az SQR fehérjék ősi, membránkötött, monotipikus, FAD kofaktorról rendelkező enzimek, molekulatömegük kb. 50 kDa (Marcia és mtsai. 2010b). Monomer állapotuk mellett képesek homodimer és -trimer formákat is kialakítani, sőt elképzelhető, hogy az oligomer forma az aktív. Prokariótákban a sejtmembránhoz a periplazmatikus oldalról kötődnek, míg eukariótákban a belső mitokondriális membránhoz az intermembrán tér felől (Cherney és mtsai. 2012).

Szekvencaanalízis alapján az SQR fehérjék előfordulása az FCC enzimekhez képest gyakoribb. Az *A. vinosum* tartalmaz FCC és SQR fehérjét is, azonban az SQR az elsődleges szulfid oxidáló enzim (Lü és mtsai. 2017; Gregersen és mtsai. 2011; Reinartz és mtsai. 1998). Az SQR enzimek bioenergetikailag hatékonyabbak, mivel a katalízisben a szulfid oxidációja során felszabaduló elektronok a kinonokon keresztül jutnak el az elektrontranszportláncba, míg az FCC-k katalízise során az elektronok a citokróm c elektronakceptorokra kerülnek, ami energetikailag kevésbé hatékony (Lü és mtsai. 2017).

### 1.4.1 SQR fehérjék különböző típusai

A legrégébbi osztályozás szerint az SQR enzimek 3 csoportba sorolhatók, attól függően, hogy Archaea-kból, baktériumokból vagy eukariótákból származnak (Theissen és mtsai. 2003). Később a szélesebb körű strukturális, biokémiai és evolúciós ismeretek eredményeként egy öt, valamint egy besorolatlan csoportból álló rendszer készült el és egy egységes nevezéktant hoztak létre (Gregersen és mtsai. 2011; Pham és mtsai. 2008). A napjainkban használatos csoportosítást Marcia és munkatársai alkották. Hat csoportot különítettek el az ismert szekvenciák klaszteranalízise, az ismert kristályszerkezetek, a konzervált aminosavak elhelyezkedése, a cisztein FAD kofaktorral való kötésének módja és az enzimek funkcionális működése alapján (Sqr I.-VI. típus [Marcia és mtsai. 2010a]). Ezen belül is jellemzik az egyes csoportok konzervált aminosavainak meglétét, elhelyezkedését, a cisztein FAD kofaktorral való kötésének módját, a kinon kötés folyamatát és a C-terminális régiót. A Gregersen és munkatársai által használt nevezéktanban betűkkel különítették el a csoportokat (**3. ábra**) (SqrA-F) (Gregersen és mtsai. 2011), ahol a betűk lényegében megfelelnek a Marcia és mtsai. által felállított csoportosítás római számainak egy apróbb eltéréssel a IV-es típusú enzimek esetén (ld. alább).



**3. ábra:** A szulfid kinon oxidoreduktáz enzimek osztályozása (Az ábra módosítva, az eredeti Marcia és mtsai. 2010a alapján)

### I. típusú SQR fehérjék (SqrA):

Ez a leginkább jellemzett család. Az *Aquificaceae*,  $\alpha$ - és  $\beta$ -*Proteobaktérium* és *Cyanobacteria* csoportokban azonosítottak ilyen típusú SQR enzimeket (Cherney és mtsai. 2010; Marcia és mtsai. 2010a). Feltehetően konstitutívan fejeződnek ki, nagy a szulfid szubsztráthoz való affinitásuk, aminek nagy jelentősége van a szulfid hatékony detoxifikálásában. Ehhez kapcsolódóan, a szulfid oxidáció során felszabadított elektronok kinon molekulákra juttatásával az SqrA enzimek a szulfid függő légzésben és a fotoszintézis folyamatában is kiemelkedő szerepet töltenek be (Marcia és mtsai. 2010a; Arieli és mtsai. 1994). Az eddig legrészletesebben jellemzett SQR enzimek közül több, az *Aquifex aeolicus*, az *A. ferrooxidans*, a *Rhodobacter capsulatus* és az *Oscillatorica limnetica* SqrA enzimek is ebbe a csoportba tartoznak (Lencina és mtsai. 2013; Gregersen és mtsai. 2011; Cherney és mtsai. 2010; Marcia és mtsai. 2010a) (**3. ábra**). Az első kettő fehérjének a szerkezete is ismert (**4. ábra A, B**). Az *A. aeolicus* SqrA aktív centrumában egy konzervált cisztein a FAD kötésében vesz részt, két cisztein a redox aktív párt alkotja és elengedhetetlenek az enzim működéséhez. A kinon redukció során a proton leadásban feltehetően egy glutaminsav és egy lizin játszik szerepet. A kinon kötésben egy izoleucin és egy fenilalanin vesz részt (Marcia és mtsai. 2010a). Az *R. capsulatus* SqrA esetén irányított mutagenézis vizsgálatok zajlottak, *O. limnetica* SqrA-t pedig biokémiaiilag és fiziológiailag jellemezték. Az SQR enzimek jellegzetes kulcsmotívumai, az ún. „sapka” hurkok az I. típusnál is megtalálhatóak. Valamint két amfipatikus hélix motívummal és a többi SQR típusal összehasonlítva hosszabb C-terminális régióval rendelkeznek. Ez a meghosszabbodott régió okozhatja, hogy a megfigyelések szerint sokkal szorosabban kapcsolódik a membránhoz a fehérje.

### II. típusú SQR fehérjék (SqrB):

Ez a típus rendelkezik a legtöbb ismert képviselővel (Sousa és mtsai. 2018). Néhány prokarióta mikroorganizmusban azonosítottak SqrB enzimet, a *Firmicutes* és *Proteobaktérium* csoportokon belül, beleértve néhány kórokozót, mint például a *Staphylococcus aureus*-t vagy *Pseudomonas aeruginosa*-t (Marcia és mtsai. 2010a; Shahak és Hauska 2008) (**3. ábra**). Az összes eukarióta SQR enzim ebbe a csoportba tartozik. Megtalálható élesztőkben (pl. *Schizosaccharomyces pombe*) (Gregersen és mtsai. 2011), férgekben (pl. *Arenicola marina*), rovarokban (pl. *Drosophila melanogaster*), kagylókban (pl. *Sinonovacula constricta*) (Shen és mtsai. 2020), emlősökben (pl. *Homo sapiens*) (Marcia és mtsai. 2010a). Az eukarióta enzimeknek más típusú SQR fehérjékkel összehasonlítva hosszabb az N-terminális szignál szekvenciája. Az SqrB fehérjék nem rendelkeznek „sapka” hurkokkal. Alacsony a

szubsztráthoz való affinitásuk. A konzervált ciszteinek közül a FAD kötésben szerepet játszó ciszteint egy tirozin helyettesíti. A két ciszteinből álló konzervált redox aktív pár jelen van. A kinon redukcióban szerepet játszó aminosavak nagyobb változatosságot mutatnak a csoporton belül az SqrA alosztályhoz képest (Marcia és mtsai. 2010a). A humán SqrB fehérje szerkezete ismert (**4. ábra C**) (Jackson és mtsai. 2019).

### III. típusú SQR fehérjék (SqrC):

Zöld kénbaktériumokban (pl. *Chlorobaculum tepidum*) és Archaea-kban (Sulfolobales) megtalálható enzimek (**3. ábra**). Nem rendelkeznek „sapka” hurkokkal (Marcia és mtsai. 2010a) vagy meghosszabbodott C-terminális régióval. A csoport egyetlen vizsgált tagja a *Caldivirga maquilingensis* SqrC. Ennél az enzimmél kísérletesen igazolták, hogy a FAD nem kovalens módon kötődik, hiszen a kötéséért felelős cisztein hiányzik, helyén konzervált triptofán vagy tirozin található (Lencina és mtsai. 2020; Lencina és mtsai. 2013). A kinon-redukció során a kinon kötésében fenilalanin, lizin és leucin aminosavak vehetnek részt (Lencina és mtsai. 2020).

### IV. típusú SQR fehérjék (SqrD):

Ez a csoport a Gregersen és mtsai. (2011) csoportosításában két részre válik szét: az SqrD és SqrX alcsoportokra. A munka során a Marcia és mtsai. (2010a) csoportosítást használjuk, ezért a IV. csoportot SqrD-vel fogom jelölni. Elsősorban zöld kénbaktériumokban (pl. *C. tepidum*), valamint bíbor kénbaktériumokban (pl. *A. vinosum*, *T. roseopersicina* (Duzs és mtsai. 2018) is azonosították őket (**3. ábra**). Az egyetlen csoport, amelynek egy képviselőjét sem tisztították és jellemezték még. Szekvenciájuk alapján öt meghosszabbodott „sapka” motívummal rendelkeznek, megnövelve ezzel a felszíni régiók hosszát. Az SQR fehérjékre jellemző három konzervált cisztein (FAD kötésben nélkülözhetetlen cisztein, a redox párt alkotó ciszteinek) az SqrD csoportban is megtalálhatóak (Marcia és mtsai. 2010a).

### V. típusú SQR fehérjék (SqrE):

Túlnyomórészt Archaea-kban található SQR fehérjék tartoznak ebbe a csoportba (pl. *A. ambivalens* SqrF) (**3. ábra**). A szulfidhoz való affinitása a  $\mu\text{M}$ -os tartományban van, ezért a szulfid függő légzés folyamatában van kulcsszerepük (Brito és mtsai. 2009). Hosszabb „sapka” hurok, valamint egy rövidebb C-terminális régió jellemzi ezt az alcsoportot az SqrA-hoz képest. A FAD-ot kötő, valamint a redox párt alkotó konzervált ciszteinek is jelen vannak. Az *A. ambivalens* SqrE enzimének kristályszerkezete ismert (**4. ábra D**) (Brito és mtsai. 2009).



Bakteriális enzimek is vannak a csoport tagjai közt (pl. *C. tepidum* SqrE) (3. ábra), azonban rövidebb „sapka” motívummal rendelkeznek (Marcia és mtsai. 2010a; Chan és mtsai. 2009). A kofaktort kötő ciszteint szerin vagy treonin helyettesíti, melyek nem képesek kovalensen kötni a FAD-ot.

#### VI. típusú SQR fehérje (SqrF):

Bakteriális fehérjék, a *C. tepidum* (Chan és mtsai. 2009), az *A. aeolicus* (Marcia és mtsai. 2010a) és a *T. roseopersicina* (Duzs és mtsai. 2018) fajokban azonosították őket (3. ábra). Ezek a legkisebb méretű SQR fehérjék. Nem rendelkeznek felszíni hurok régiókkal. Az SQR-ekre jellemző három konzervált ciszteinből kettő jelen van, egy cisztein hiányzik, ez a legjellegzetesebb tulajdonsága a csoportnak. Közülük az egyik cisztein kovalensen köti a FAD-ot (Shuman és Hanson 2016). Egy másik alapvető jellegzetessége ennek a csoportnak, hogy van egy cisztein, amely konzerváltságot mutat a VI. típuson belül és csak ebben található meg, azonban az aktív centrumtól távol helyezkedik el (Shuman és Hanson 2016). Ezek eredményeképp egy eltérő katalitikus mechanizmust feltételeznek (Duzs és mtsai. 2018), vagy a feltekeredés folyamata tér el egyedi fehérjeszerkezetet eredményezve. További sajátosság, hogy a C-terminális régió itt a legrövidebb, a három ellentétes irányban futó  $\beta$ -lemez mellett csak egy  $\alpha$ -hélix alkotja (Marcia és mtsai. 2010a). Alacsony a szubsztráthoz való affinitása. Kevésbé ismert csoport, kevés jellemzett tagja van (Duzs és mtsai. 2018; Shuman és Hanson 2016).

#### **1.4.2 SQR fehérjék termeltetése**

SQR típusú fehérjéket számos mikroorganizmusban azonosítottak, azonban kevés ismerettel rendelkezünk szerkezetükről és biokémiai jellemzőikről. Ennek egyik oka, hogy a fehérje előállítása tiszta, aktív formában számos lépésből áll, számos enzim esetében nem sikerült erre alkalmas módszert kifejleszteni. Másik ok – különösen az SqrD enzimek esetében – a fehérjék erős membránkötődése (Duzs és mtsai. 2018).

Az SQR fehérjéket vagy egyszerűen kitisztították a gazdasejtéből, vagy homológ, illetve heterológ expresszióval termeltették meg, majd a membránból valamilyen detergenssel való felszabadítást követően kromatográfiás módszerrel tisztították. Az *A. ferrooxidans* SqrA (Cherney és mtsai. 2012; Wakai és mtsai. 2007; Bronstein és mtsai. 2000), az *R. capsulatus* SqrA (Schutz és mtsai. 1997), az *A. caldus* SqrA (Lu és mtsai. 2023), az *S. aureus* SqrB (Shen és mtsai. 2016), a *Homo sapiens* SqrB (Jackson és mtsai. 2019), a *C. maquililingensis* SqrC (Lencina és mtsai. 2020, 2013) és a *C. tepidum* SqrF (Shuman és Hanson 2016) fehérjéket heterológ módon *E. coli* sejtekben T7 RNS polimerázon alapuló termeltetéssel állították elő.

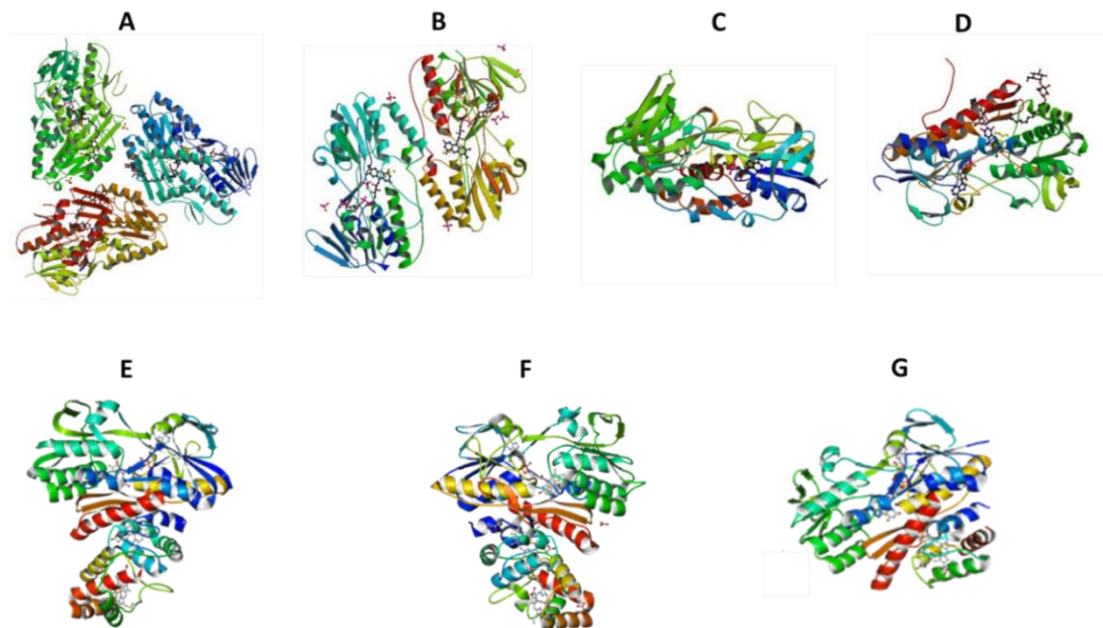
Az *A. aeolicus* SqrA (Marcia és mtsai. 2010b), az *A. ambivalens* SqrE (Brito és mtsai. 2009), a *T. roseopersicina* SqrF (Duzs és mtsai. 2018) enzimeket saját természetes gazdájukban termeltették vad típusú rendszerben vagy a gének expressziós kazettába történő klónozását követően, majd innen tisztították őket.

### 1.4.3 SQR fehérjék szerkezeti jellemzői

Az SQR típusú fehérjék közül kevésnek ismert a szerkezete. Az *A. ferrooxidans* SqrA (Cherney és mtsai. 2012, 2010), az *A. aeolicus* SqrA (Marcia és mtsai. 2009), a *H. sapiens* SqrB (Jackson és mtsai. 2019) és az *A. ambivalens* SqrE (Brito és mtsai. 2009) rendelkeznek röntgenkristallográfiai szerkezettel. Továbbá az FCC fehérjék között is megtalálható néhány meghatározott kristályszerkezetű enzim: az *A. vinosum* (Chen és mtsai. 1994) a, *Thioalkalivibrio paradoxus* (Osipov és mtsai. 2018) (**4. ábra E, F, G**).

A legpontosabb és legrészletesebb térszerkezeti adatokat, kölcsönhatásokat, feltekeredést röntgenkristallográfiával lehet meghatározni és ezek számottevően hozzájárulnak az enzim katalitikus mechanizmusának megismeréséhez. Az *A. aeolicus* SqrA fehérje meglepő módon trimer formában kristályosodott, amelyet a fehérje fiziológias állapotának gondolnak, és segíti a membránba ágyazódást (**4. ábra A**) (Marcia és mtsai. 2009). A kristályosított SQR enzimek között eddig a homotrimer forma mellett monomer és homodimer negyedleges szerkezetek fordultak elő. Az *A. ferrooxidans* SqrA fehérje esetén dimer formát azonosítottak a kristályszerkezetben, amely feltehetően eltér a fiziológias állapottól a monomerek egymáshoz viszonyított helyzete alapján, vagyis a hidrofób, természetes körülmények között a membránhoz kapcsolódó felszínek kölcsönhatnak egymással (**4. ábra B**). Ezáltal az amfipatikus hélixek hidrofób közegbe kerülnek, mintha a membránba ágyazódnának normál állapotban (Jackson és mtsai. 2019; Cherney és mtsai. 2010). *In vivo* körülmények között az aktív fehérje feltehetően így tartja fent a megfelelő orientációt az optimális működéshez membrán hiányában (Cherney és mtsai. 2010). A humán SqrB fehérje hasonlóan az előbbihez, kristályosítás során dimer formát vett fel, ami feltehetően eltér a fiziológias állapotától, és valószínűleg természetes körülmények között monomerként épül be a membránba és látja el funkcióját (**4. ábra C**) (Jackson és mtsai. 2019). A két SqrA, valamint a humán SqrB fehérjéket elektronakceptorral kötött formában is kristályosították, ez előbbieken esetén decilubikinon (dUQ), utóbbinál decil-koenzim Q (ubidekarenon) volt (**10.4. melléklet**) (Jackson és mtsai. 2019; Cherney és mtsai. 2010). Az *A. ambivalens* SqrE fehérjét dimer állapotban kristályosították aszimmetrikus helyzetben (**4. ábra D**). A C-terminális régió utolsó

53 aminosavának térbeli elhelyezkedését azonban nem sikerült meghatározni (Brito és mtsai. 2009).

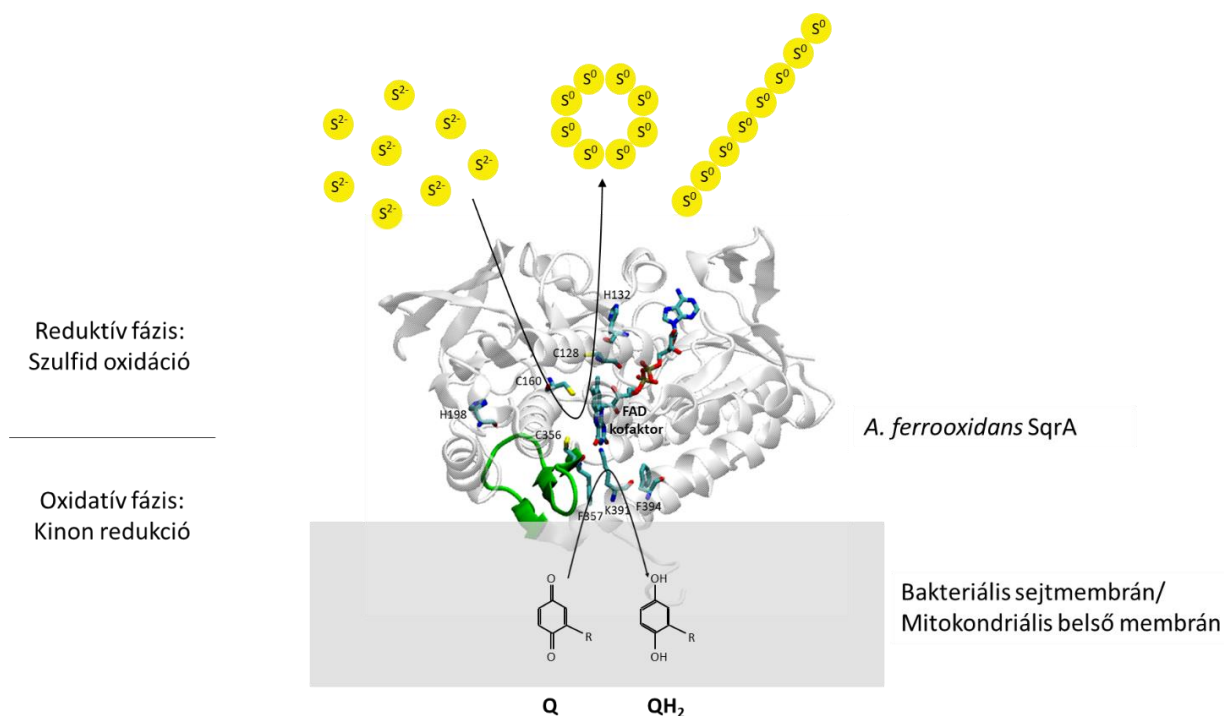


**4. ábra:** Röntgenkristallográfiával meghatározott szerkezetű SQR és FCC fehérjék. A: *A. aeolicus* SqrA (Marcia és mtsai. 2009), B: *A. ferrooxidans* SqrA (Cherney és mtsai. 2010), C: *H. sapiens* SqrB (Jackson és mtsai. 2019), D: *A. ambivalens* SqrE (Brito és mtsai. 2009), E: *A. vinosum* FccAB (Chen és mtsai. 1994), F: *T. tepidum* FccAB (Hirano és mtsai. 2012), G: *T. paradoxus* FccAB (Osipov és mtsai. 2018)

#### 1.4.4 Az SQR enzimek által katalizált reakciók főbb lépései

Az SQR enzimek működésében, a szulfid oxidációja folyamán leadott elektronok a kinon molekulákra kerülnek. Ez egy komplex redox folyamat, ami két lépésben megy végbe. Az első szakasz a szulfid oxidáció vagy redukív fázis. Egy szulfid ( $S^{2-}$ ) oxidálódik elemi kéné ( $S^0$ ), amely során két elektron kerül a FAD kofaktorra, és redukálja azt (Brito és mtsai. 2009). A második szakasz a kinon redukciója, az oxidatív fázis. A redukált FAD kofaktor a két elektront a kinon molekuláknak adja át, melyek a prokarióta citoplazma membránban vagy eukarióták esetén a belső mitokondriális membránban helyezkednek el (**5. ábra**) (Brune és Trüper 1986).

A katalitikus ciklusok ismétlődésének eredményeképp keletkező oxidált kén molekulák összekapcsolódnak és egy oktamer gyűrű ( $S^8$ ) vagy egy rövid, egyenes vagy elágazó poliszulfid lánc ( $HS-(S_n)-SH$ ) képződik (**5. ábra**). A keletkezett termék a létrejötte után elhagyja az SQR enzim aktív centrumát egy hidrofób csatornán keresztül és kénglobulusok formájában raktározódik el a sejtek citoplazmájában vagy a periplazmában (Lyrtzakis és mtsai. 2023; Griesbeck és mtsai. 2000; Marcia és mtsai. 2009).



**5. ábra:** Az SQR enzimek által katalizált reakció általános sémája az *A. ferrooxidans* SqrA szerkezetének (Cherney és mtsai. 2010) felhasználásával. Q: kinon, QH<sub>2</sub>: redukált kinon

#### 1.4.4.1 A szulfid bejutása az SQR aktív centrumába, a fehérje FAD kofaktor kötése

Csak az SQR és FCC fehérjék rendelkeznek ún. „sapka hurokkal” az FDR családon belül, amely eltérő hosszúságú a két típus között. Valószínűleg azért felelős, hogy csak a szulfid elektrondonor jusson az aktív centrumba (Sousa és mtsai. 2018; Marcia és mtsai. 2010a). A család többi tagjában ez a régió a NAD(P)H kötőhelynek felel meg (Walsh és mtsai. 2020).

Az SQR fehérjék aktív centrumát többek között a FAD kofaktor, valamint a közelében elhelyezkedő legalább két konzervált cisztein, a redox aktív pár alkotja, melyek diszulfid-híddal kapcsolódnak egymáshoz és kiemelkedő szerepük van a katalízis szulfid oxidációs lépésében (Brito és mtsai. 2009). Az SQR és FCC fehérjék három FAD-kötő doménnel rendelkeznek. Ezek az N-terminális  $\beta\alpha\beta$  szerkezet, egy N-terminális, valamint egy C-terminális motívum (Griesbeck és mtsai. 2000). A FAD kofaktor az SQR enzimekben a diszulfid reduktáz proteinekhez hasonló pozícióban helyezkedik el az aktív centrumban. Az első Rossmann-fold szerkezet tartalmazza a FAD kofaktort és kötést alakít ki vele nem kovalens módon. A másik Rossmann-fold szerkezet elsődlegesen a szulfid kötés és oxidáció katalitikus helye. Néhány enzimben azonban szintén kötődik a kofaktorhoz, méghozzá a FAD izoalloxazin gyűrűjével áll kapcsolatban kovalens vagy nem kovalens kötések keresztül. Ez típusonként változó (Duzs és mtsai. 2021; Walsh és mtsai. 2020). Továbbá ennek a gyűrűnek a közelében helyezkedik el a redox aktív diszulfid-hidat formáló két konzervált cisztein is (Duzs és mtsai. 2021).

Az I., a IV., az archeális V., valamint a VI. típusú SQR fehérjék többnyire kovalensen kötik a kofaktort. Az egyik konzervált cisztein kén atomjának szulfhidril csoportja és a FAD C8 metil (C8M) csoportja között alakul ki a stabil tioéter kötés (Walsh és mtsai. 2020; Chen és mtsai. 1994). Ilyen például az *R. capsulatus* SqrA (Griesbeck és mtsai. 2002) vagy az *A. ambivalens* SqrE (Brito és mtsai. 2009). Különbséget mutat az *A. aeolicus* SqrA, melyben a Cys124 kovalensen kapcsolódik a FAD-hoz, azonban ez egy kevésbé stabil perszulfid-hídon keresztül valósul meg (**6. ábra**) (Marcia és mtsai. 2009).

Az *A. ferrooxidans* SqrA Cys128 egyáltalán nem köti a kofaktort, az aminosav kén atomja és a gyűrű C8M csoportja között a távolság feltehetően túl nagy a kristályosított fehérjében mért távolságadatok alapján (3,6 Å) ahhoz, hogy kialakuljon a kapcsolat (**7. ábra**) (Cherney és mtsai. 2010).

Az *A. caldus* SqrA enzimben a Cys128 nem köti kovalensen a FAD-ot, ugyanis a fehérje TCA-s denaturálását követően a felülúszóban volt azonosítható a kofaktor. Az enzim homológia modelljében mért távolságadatok alapján pedig a Cys128 és a FAD izoalloxazin gyűrűjének C8M csoportja közötti távolság túl nagy a kötés kialakulásához (4 Å) (**7. ábra**) (Lu és mtsai. 2023).

A II., a III. és a bakteriális V. típusú SQR fehérjék esetén a kötésért felelős cisztein hiányzik, helyette tirozin, triptofán, szerin vagy treoinin található. Így ezekben az enzimekben a FAD kofaktorról nem alakul ki kovalens kötés (Walsh és mtsai. 2020; Lencina és mtsai. 2013). Ilyen a *H. sapiens* SqrB (Jackson és mtsai. 2012), az *S. aureus* SqrB (Jackson és mtsai. 2019; Shen és mtsai. 2016), valamint a *C. maquilingensis* SqrC (Lencina és mtsai. 2013).

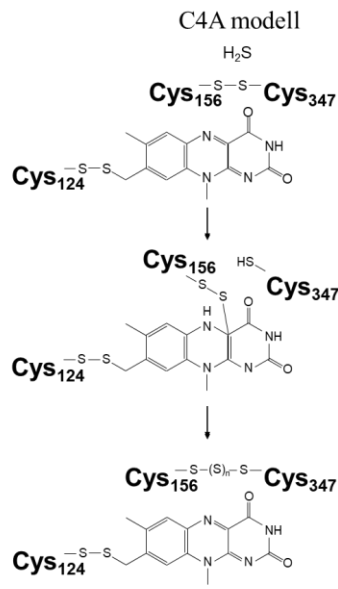
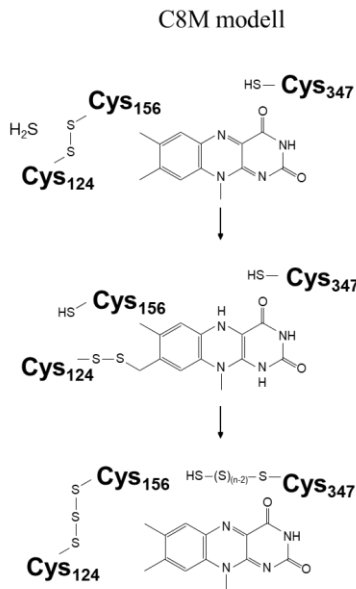
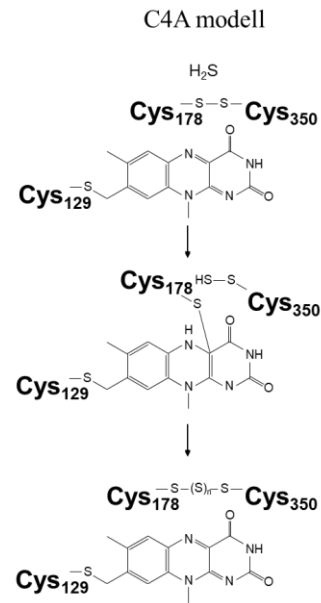
#### **1.4.4.2 A katalízis szulfid oxidációs lépése és a konzervált ciszteinek szerepe**

A diszulfid oxidoreduktáz (DSR) enzimes családon belül az aktív centrumban elhelyezkedő konzervált ciszteineknek nélkülözhetetlen szerepe van a szulfid oxidációjában (Marcia és mtsai. 2010). Ezek a FAD környezetében helyezkednek el, azonban a számuk, valamint a térszerkezetben elfoglalt helyük változatos a különböző SQR csoportok esetén (Argyrou és mtsai. 2004). Ettől függően az eddig jellemzett fehérjék alapján többféle katalitikus mechanizmust feltételeznek az SQR fehérjéken belül. A különböző típusoknak eltérhet a működése, valamint egy enzim esetében is felmerülhet a katalízis folyamatának több lehetséges módja is. A különböző feltételezett mechanizmusokat többek között a megismert röntgenkristallográfiás szerkezetek, a meghatározott kinetikai paraméterek, valamint az aminosav-kofaktor, aminosav-aminosav között mért távolságadatok alapján állították fel (Cherney és mtsai. 2010; Brito és mtsai. 2009; Marcia és mtsai. 2009).

Az *A. aeolicus* SqrA fehérjében két lehetséges működési modellt (C4A, C8M) feltételeznek. Ennek oka az, hogy az egyik feltételezett modell (C8M) jelentős központi szerepet tulajdonít a Cys124-nek. Ez az aminosav a legtöbb SQR enzimben konzerváltan jelen van, viszont hiányzik az SqrB és SqrC fehérjékből, így ezekben valószínűleg eltér a mechanizmus, amelyben egy másik ciszteinnek van kiemelkedő szerepe.

Az *A. aeolicus* SqrA katalitikus mechanizmusának C8M feltételezett modellje szerint a Cys124 és Cys156 között alakul ki a diszulfid kötés. A szulfid szubsztrát kénje a Cys124 diszulfid-hídját támadja. Ezt követően pedig (Cys124S-S) a FAD izoalloxazin gyűrűjének C8M csoportjával alakít ki átmenetileg perszulfid-hidat. Egy elektron átkerül a kofaktorra. Ezután ezt a perszulfid kötést támadja a Cys156 triszulfid hidat képezve a szubsztrát és a Cys124 kénjeivel (Cys156S-S-Cys124S). Ezen lépés közben jut át a második elektron az izoalloxazin gyűrűre és válik a FAD teljesen redukálttá. Ebben a modellben a Cys347 nem része a redox aktív párnak, hanem feltehetően regenerálja a Cys124-Cys156 diszulfidot a kén átvételével és a növekvő poliszulfid lánc kötésével (**6. ábra**) (Marcia és mtsai. 2010a; Marcia és mtsai. 2009).

Az *A. aeolicus* SqrA másik modellje (C4A) hasonlóságot mutat az *A. ambivalens* SqrE feltételezett mechanizmusával. Előbbi esetén a Cys156 és Cys347, míg utóbbinál a Cys178 és Cys350 alkotják a diszulfid-híddal kapcsolódó redox aktív párt. Ezt támadja meg a szulfid, majd az *A. aeolicus* SqrA Cys156S-S, vagy az *A. ambivalens* SqrE Cys178S-S perszulfid-hidat képez a FAD C4A atomjával. Az elektronátadás után tri- később poliszulfid-híd alakul ki a redox aktív pár között (*A. aeolicus* SqrA esetén Cys156S-S-Cys347S, *A. ambivalens* SqrE esetén Cys178S-S-Cys350S). E két cisztein között épül a termék, mely *A. aeolicus* SqrA esetén egy poliszulfid lánc, míg az *A. ambivalens* SqrE végterméke egy 8 kénatomból álló gyűrű (Marcia és mtsai. 2009; Griesbeck és mtsai. 2000). Ezeknél a feltételezett C4A modelleknél a FAD-ot kötő cisztein nem vesz részt közvetlenül a katalitikus működésben. A kofaktort a C8M csoporton keresztül egy diszulfid-hídon keresztül köti ez a cisztein (**6. ábra**) (Brito és mtsai. 2009; Marcia és mtsai. 2009).

*Aquifex aeolicus* SqrA*Acidianus ambivalens* SqrE

**6. ábra:** Az *A. aeolicus* SqrA és az *A. ambivalens* SqrE katalitikus működésének lehetséges modelljei (Marcia és mtsai. 2010a; Brito és mtsai. 2009; Marcia és mtsai. 2009)

Az *A. ferrooxidans* SqrA enzim feltételezett működési modellje szerint a Cys160 és Cys356 alkotják a diszulfid-hiddal kapcsolódó redox párt. Ezt támadja a belépő szulfid, majd a Cys356 (Cys356S-S) a FAD izoalloxazin gyűrűjének C4A atomjához kötődik és egy elektron átkerül a kofaktorra. Majd a cisztein-FAD perszulfid hidat támadja a Cys160 triszulfid hidat képezve a Cys356-tal (Cys160S-S-Cys356S), így átjut a második elektron és teljesen redukálódik a FAD. Ez a folyamat ismétlődik, amíg el nem éri a maximális hosszát a polyszulfid lánc, amely feltehetően ezen a Cys160-on növekszik, majd 8 atomból álló kénygyűrűvé záródik. Valószínűleg a Cys128 kapcsolódhat a Cys160-hoz, ezáltal válik le az elkészült kéntermék (**7. ábra**) (Cherney és mtsai. 2010).

Az *A. caldus* SqrA enzim feltételezett modellje megegyezik az *A. ferrooxidans* SqrA enzimmél leírt működési modellel. Eltérést feltételeznek abban, hogy a 8 kénatomból álló termék a Cys356-on hosszabbodik. A Cys128 a kéntermék gyűrűvé záródásában és a citoplazmába juttatásában játszhat szerepet (**7. ábra**) (Lu és mtsai. 2023).

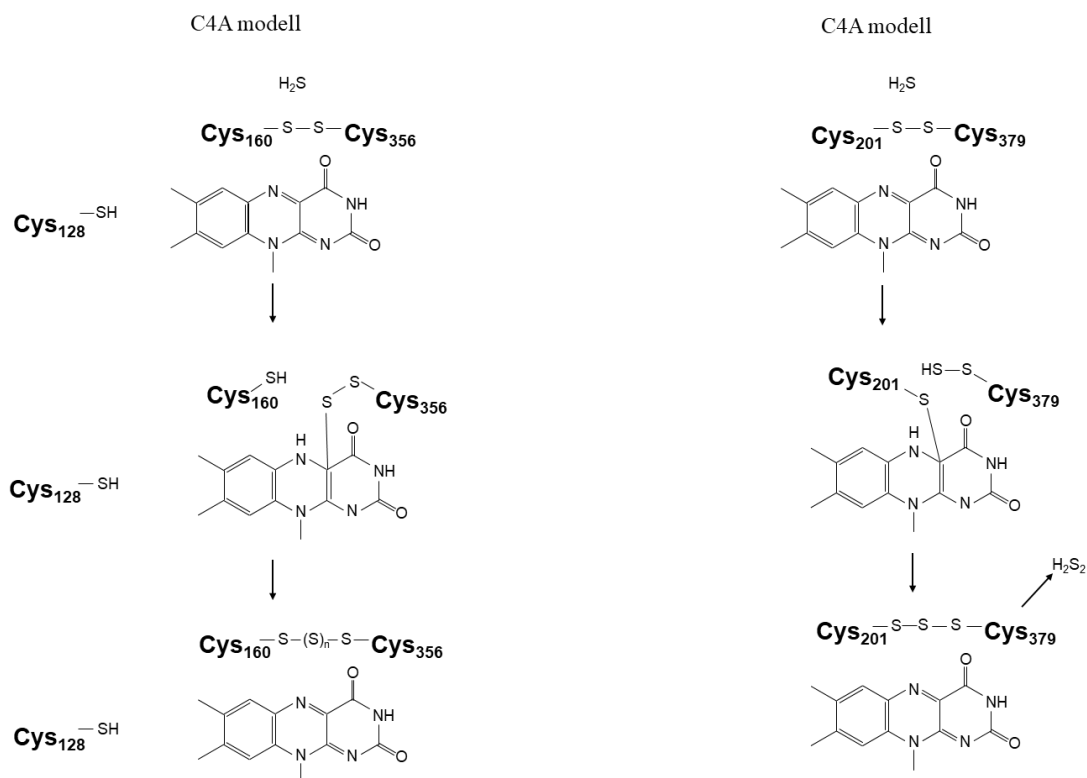
A *H. sapiens* SqrB enzimben a konzervált Cys201 és a Cys379 alkotják a redox aktív párt (Jackson és mtsai. 2019). A Cys201 a FAD C4A csoportját köti (Chen és mtsai. 1994). A szulfid szubsztrát a Cys379-t támadja, egy redox intermedier jön létre, egy fehérje-kötött perszulfid kötés, valamint egy töltés transzfer komplex (CTC) a FAD és a ciszteinek kénjei között. Amint megtörténik az elektronátadás a kofaktornak, a redox aktív pár ismét diszulfid-hiddal összekapcsolódik és az elektronok a koenzim Q (**10.4 melléklet**) akceptorra

kerülnek a FAD-ról (Jackson és mtsai. 2019, 2012). A *H. sapiens* SqrB enzim feltételezett működési mechanizmusa közelebb áll az FCC enzimekéhez. Előbbi a bakteriális SQR fehérjéktől abban tér el, hogy a képződő termék nem poliszulfid lánc vagy kéngyűrű, hanem hidrogén-diszulfid ( $H_2S_2$ ). Mivel kis méretű termék képződik, a redox aktív párt alkotó ciszteinek közelebb helyezkednek el egymáshoz a humán SqrB-ben a bakteriális enzimekhez képest (7. ábra) (Jackson és mtsai. 2019; Hirano és mtsai. 2012).

Az *A. vinosum* FCC esetén a Cys161 és a Cys337 alkotják a redox aktív párt. A FAD kofaktort a Cys42 köti kovalensen (Hirano és mtsai. 2012; Chen és mtsai. 1994). A szubsztrát támadja a diszulfid hidat képező ciszteineket, majd egy töltéstranszfer komplex alakul ki és redukálódik a FAD (Kostanjevecki és mtsai. 2000; Van Driessche 1996).

*Acidithiobacillus ferrooxidans/Acidithiobacillus caldus* SqrA

*Homo sapiens* SqrB



7. ábra: Az *A. ferrooxidans* SqrA, az *A. caldus* SqrA és a *H. sapiens* SqrB katalitikus működésének lehetséges modelljei (Marcia és mtsai. 2010a; Brito és mtsai. 2009; Marcia és mtsai. 2009)

#### 1.4.4.2.1 A konzervált glutaminsav szerepe az SQR enzimek katalitikus mechanizmusában

A szekvenenciaanalízis adatok alapján az SQR típusú fehérjékben a ciszteineken kívül egyéb, nagymértékben konzervált aminosavak is megtalálhatók, amelyek az enzimek nagy részében jelen vannak adott pozícióban, és így szerepük lehet a fehérjék működésében.



A II. típusú NADH:kinon oxidoreduktáz (NDH-2) több mikroorganizmusban is megtalálható, például az *S. aureus*-ban vagy az *S. cerevisiae*-ben. Ez az enzim a tDBDF szuperfamilia tagja. Az NDH-2-ben részletesen vizsgálták a 172. pozícióban lévő glutaminsav szerepét. Szekvencaanalízis alapján ez az aminosav 97%-os konzerváltságot mutat a szuperfamiliaon belül (Marreiros és mtsai. 2017). Korábbi kísérletek során alaninra, szerinre, aszparaginsavra, valamint glutaminra cserélték, amelyek hosszukban és/vagy polaritásukban térnek el az eredeti aminosavtól. Mind a négy mutáció hatással volt a NAD(P)H szubsztrát oxidációs folyamatára is, de a kinon redukcióban jelentősebb változást okoztak (Sousa és mtsai. 2017). Az eredmények alapján a Glu172 feltehetően a protontranszferben játszhat jelentősebb szerepet. Az *S. cerevisiae* NDH-2 fehérjében a homológ Glu242 alaninra és aszpartátra cserélése hatással van az enzim kinetikai paramétereire. Ez szintén alátámasztja a feltételezést, hogy az NDH-2 katalitikus mechanizmusában is fontos szerepe lehet ennek a konzervált glutaminsavnak (Marreiros és mtsai. 2017). Az *S. aureus* NDH-2 Glu172 protonáltsága függ a FAD oxidáltsági állapotától, ami arra utal, hogy a Glu172-nek kulcsszerepe lehet a kinon kötőhelyhez történő proton szállításban (Marreiros és mtsai. 2017; Sousa és mtsai. 2017).

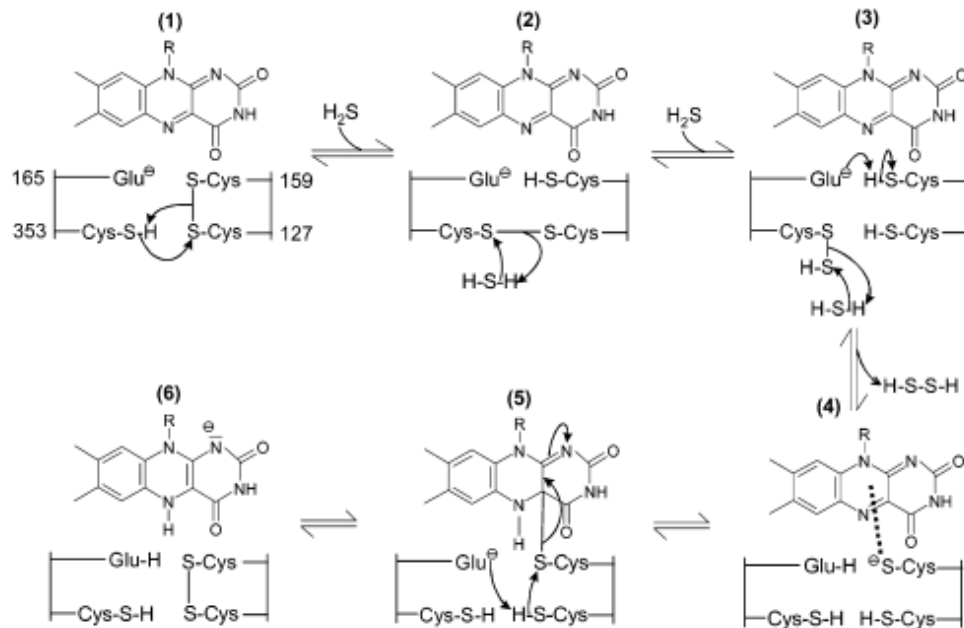
Az NDH-2 enzimek ugyanabba a családba tartoznak, mint az SQR és FCC fehérjék. Ez a glutaminsav utóbbi két fehérje esetén is jelentős konzerváltságot mutat és az aktív centrumban található konzervált ciszteinek körül helyezkedik el. Azoknál, ahol jelen van a NAD kötőhely, ott a vizsgált glutaminsav (például humán vörösvérsejt glutation reduktáz enzim Glu201 vagy az *S. aureus* NDH-2 Glu172) kapcsolatban van egy másik aminosavval, ami a NAD kötésben vesz részt. Az SQR és FCC enzimekben is több kutatócsoport vizsgálta az NDH-2 Glu172-vel homológ, azonos pozíciójú glutaminsav feltételezett szerepét a működésben, náluk azonban hiányzik ez a NAD-ot kötő aminosav (Van Driessche 1996).

Az *R. capsulatus* SqrA fehérje katalitikus mechanizmusára felépítettek egy lehetséges modellt az *S. aureus* Glu172-vel homológ glutaminsav részvételével. Ez az aminosav az SQR-ekben és FCC-kben is konzervált, mindenhol megtalálható ebben a pozícióban (például *A. vinosum* FCC Glu167, *R. capsulatus* SqrA Glu165, *T. roseopersicina* SqrF Glu163), kivéve az SqrB enzimeket, ahol bázikus lizin helyettesíti ezt a savas aminosavat (**8. ábra**) (Sousa és mtsai. 2018).

<i>A. ferrooxidans</i>	SqrA	MAGASCF-GPAYEYAMIVASDLKRRGMRDK
<i>A. aeolicus</i>	SqrA	IPGVSCF-GPAYEFALMLHYELKRRGIRYK
<i>R. capsulatus</i>	SqrA	AQGASCF-GPAYEFTFLDALTALRRKRKIRDK
<b>Glu165</b>		
<i>H. sapiens</i>	SqrB	NTPVKCA-GAPQKIMYLSEAYFRKTGKRSK
<i>Synechocystis sp.</i>	SqrB	ATPIKCA-GAPQKIMYLADETFRRKNGVREK
<i>S. pombe</i>	SqrB	SGVLKCA-GAPQKIMWMAEDYWRRHKVRSN
<i>S. solfataricus</i>	SqrC	KLPHRCP-VAPLEVTLLDDYLRRKGIRDK
<i>C. tepidum</i>	SqrC	ELPFKCP-VAPIEFVFMADWFLKKKGVRNK
<i>C. maquilingensis</i>	SqrC	YERYRCP-PSPLEGVLLADELLRRRGVRDR
<i>A. vinosum</i>	SqrD	HGMC TCQ-GAAFEYIYNVDHVLRGAGVRHL
<i>S. denitrificans</i>	SqrD	HGLCTCQ-GAAFEYIFNIEHELKAGVRDM
<i>C. tepidum</i>	SqrD	HAMATCQ-GAAFEYILNVAHEISRGLSHM
<i>A. ambivalens</i>	SqrE	NADSACE-GPVFEMSLMLHGYFKKKGMLDK
<i>S. solfataricus</i>	SqrE	VADAACE-GPIEFEMSLMLSGYFKKKGMLNK
<i>C. tepidum</i>	SqrE	MAKAACE-GPPVEIALSLASWMMKHEMGGP
<i>A. aeolicus</i>	SqrF	-DKTAVRGRPVFEVLFNVDYHLSRLGIRDR
<i>C. tepidum</i>	SqrF	-DPSAVRGGPGFEFFNLHKKLTKLGIRDN
<i>A. vinosum</i>	SqrF	-EPSSMRGGPVFEFLFGMDNQLKREGRRDK
<i>T. roseopersicina</i>	SqrF	-EPSSMRGGPIFEFIFGMSQLRKEGRRDR
<i>T. roseopersicina</i>	FccB	PANPFRCPPGPYERASQIAHYFKANKPKSK
<i>A. vinosum</i>	FccB	PAAPFRCPPGPYERASQVAYYLKAHKPKSK
<i>C. tepidum</i>	FccB	PDNPFRCPPGPYERASLIAYYLKQHKPKSK
<i>A. aeolicus</i>	FccB	PPPHRCPPAPYERAAMIAHVFRQNEAKAK

**8. ábra:** *R. capsulatus* SqrA Glu165 homológjai a különböző típusú SQR és FccB fehérjékben. Zöld: glutaminsav, kék: lizin

Az *R. capsulatus* SqrA fehérjében is megtalálható a két redox aktív cisztein, amelyek diszulfid-hidat formálhatnak (Cys127 és Cys159), a Cys353 pedig a szulfid koordinálásában játszhat szerepet. A szulfid szubsztráttal való reakció során egy perszulfid-híd alakul ki a Cys127 és Cys353 között. Majd egy második szulfid molekula támadja ezt a perszulfid-hidat, így mindkét cisztein tiolált állapotba kerül (C-S-H), és felszabadul az elsődleges kéntermék, mint perszulfid molekula (H-S-S-H). A Glu165 a redox aktív párt alkotó másik ciszteintől (Cys159) elvon egy protont, így kialakul a CTC komplex a Cys159 és az oxidált FAD<sup>+</sup> között. Ez a cisztein a kofaktor C4 atomjával egy átmeneti kovalens kötést hoz létre, amelynek eredményeként a FAD<sup>+</sup> redukálódik és újra kialakul a diszulfid-híd a Cys127 és Cys159 között (9. ábra) (Griesbeck és mtsai. 2002).



**9. ábra:** *R. capsulatus* SqrA feltételezett működési modellje a Glu165 részvételével (Griesbeck és mtsai. 2002)

Az *A. vinosum* FCC esetén az 1.4.4.2 fejezetben részletezett működési modellben a konzervált Glu167 is feltételezhetően szerepet játszik, szintén vélhetően a proton transzferben, az SQR enzimekhez hasonlóan. Várhatóan a redox aktív párt alkotó egyik ciszteintől von el egy protont és továbbítja a FAD felé (Van Driessche, 1996).

### 1.4.4.3 SQR fehérjék C-terminális doménje

Az FDR enzimes családon belül specifikus szerkezeti régió a C-terminális vagy másnéven interfész domén. Az SQR enzimek esetén ez a domén a katalitikus működés kinon redukciós lépésének a helye. Ebben a régióban történik meg a kinon bejutása a FAD kofaktor közelébe az aktív centrumban, illetve az elektronok továbbítása az elektronakceptorra.

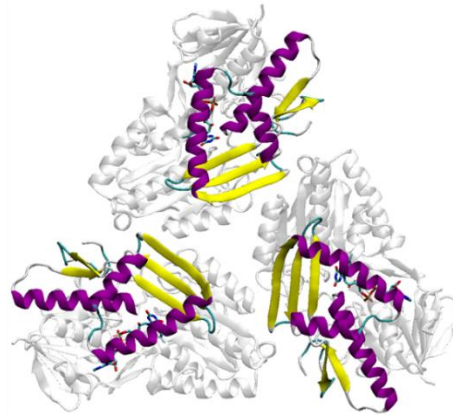
Az SQR fehérjecsaldon belül nagyon változatos a C-terminális régió (**10. ábra**), például eltérhetnek a membránköti motívumok (Marcia és mtsai. 2010a). Általában három antiparallel szakaszból álló  $\beta$ -lemez alkotja, amit C-terminális irányban leggyakrabban két  $\alpha$ -hélix követ (Lencina és mtsai. 2020, 2013; Marcia és mtsai. 2010a). A domént alkotó amfipatikus hélixek nagy flexibilitással rendelkeznek. Bioinformatikai szerkezet modellezés adatok alapján az SQR fehérjék ezeknek a hélixeknek a hidrofób aminosavainak a közreműködésével integrálódnak a membránba (Zhang és mtsai. 2016; Lencina és mtsai. 2013; Cherney és mtsai. 2010). A C-terminális régiót nagy számú hidrofób aminosav alkotja, melyeknek nagy szerepe van a kinon kötőhely kialakításában, a kinon szubsztrát bejutásában a kinon redukció folyamata során. Ezen a kinon kötő csatornán keresztül kerül az

elektronakceptor az aktív centrumban a FAD kofaktor izoalloxazin gyűrűjének közelébe és így tud megtörténni az elektronok átadása (Marcia és mtsai. 2010a).

<i>A. ferrooxidans</i>	SqrA	GRWVHLAK-VAFEKYFIRKMKI-GVSEPFYEKVLFKMMGITRLKEEDAHRKAS voooooooo oooooooooooooo ~~~~~oooooooooooo~
<i>R. capsulatus</i>	SqrA	GKWVHWAK-EGFERYFMHKLRR-GTSETFYEKAAMKLLGIDKLGK--AVKKG
<i>A. aeolicus</i>	SqrA	GKWAHYFK-TAFEKYFLWKVRN-GNIAPSFEEKVLEI-FLK-VHPIELCKDCEGAPGSRG voooooooo oooooooooooooo ~~~~~oooooooooooo oo ~~~vVV~
<i>H. sapiens</i>	SqrB	RLSMYLMKADLMPFLYWNMLLR-GYWGGPAFLR-KLFHLGMS
<i>Synechocystis sp.</i>	SqrB	RWSMWLVKRYVLPWLYWNRMLK-GESFEPDKWK-PLLGKS
<i>S. pombe</i>	SqrB	RRMFYHLKKDFPFVYWNFAVRNGKWYGSRGLIPPHFPVN
<i>S. solfataricus</i>	SqrC	SYVHWGK-IMYNKMYWTVTAK-AVV
<i>C. tepidum</i>	SqrC	TKMNWYGK-LAFEPLYWNVLLD-GKHLGMPPTLVMA----GKEVG
<i>C. maquilingensis</i>	SqrC	NRINHFLK-LTFAASYWSMLKY-PELWDPLMEAYFEATSPERLIGLFR oooooooo ooooo~ ~~~~~oooooooooooo~
<i>A. vinosum</i>	SqrD	PDY-E--TYPEYGRDMDLTFGEIGLAG--HWMKYLLHHVFIYQAKLRPGWSVLPD
<i>S. denitrificans</i>	SqrD	PDF-D--KYPGTGRD TDYTFGEIGLAG--HWIKHILHHLFLWKAKLKAGWTLIPE
<i>C. tepidum</i>	SqrD	PDW-E--KYPEWGRDMTYSVGEVGLAG-HWLKFMHLHYLFFHKAKGYPFWYLIPE
<i>A. ambivalens</i>	SqrE	PAAVNHLKKELF TKYMWTKGDMA-LEKFLASW
<i>S. solfataricus</i>	SqrE	PSPINHKKELFHKYFIWTKGDMA-LEKFLASW
<i>C. tepidum</i>	SqrE	KLYYDLKVAFKTSYFAMGGKVPYQWKM-GSWMGDKIL
<i>A. aeolicus</i>	SqrF	PVLGHIMK-KAWGVYYK-LYKLGKIPKII
<i>C. tepidum</i>	SqrF	PVVGHWLK-KAWGYYYK-LSKMKYIPRIPGM
<i>A. vinosum</i>	SqrF	MRLFHWLK-RFFEWLYLRRYR
<i>T. roseopersicina</i>	SqrF	TRFFHWMK-LGF EWYLRPYR oooooooo oooooooooooooo

**10. ábra:** Az SQR típusú fehérjék C-terminális doménjének szekvenciája. A lila o betű  $\alpha$ -hélix, a lila v betű  $\beta$ -lemez szerkezeteket kialakító aminosavakat jelöl

Az *A. aeolicus* SqrA a kristályszerkezete alapján egy homotrimer, periplazmatikus integráns monotopikus membránfehérje, számítások szerint 12 Å mélyen beágyazódva a lipid kettős rétegbe. A hosszú C-terminális domént két amfipatikus  $\alpha$ -hélix alkotja, ezek szükségesek a kinon kötő csatorna kialakításához (**11. ábra**) (Marcia és mtsai. 2009). A C-terminális ezt követő régió 413-430. aminosavig tartó szakaszának fontos szerepe lehet a fehérje alegységek közötti kapcsolatok kialakításában, vagyis a homotrimer forma létrehozásában. Továbbá fontos szerepe van ennek a régióknak a stabil membránba ágyazódás megvalósításában (Marcia és mtsai. 2010a).



**11. ábra:** Az *A. aeolicus* SqrA szerkezeti modellje. A C-terminális régió a színezéssel kiemelt rész. Sárga jelöli a  $\beta$ -lemezeket, lila jelöli az  $\alpha$ -hélix szerkezeteket

Az *A. ferrooxidans* SqrA a kristályszerkezetben dimer állapotú, mely számítások alapján 20 Å mélyen épül a membránba, ami körülbelül a membránvastagság fele. Szintén két amfipatikus  $\alpha$ -hélix alkotja a C-terminális régiót, ami gazdag hidrofób aminosavakban és az oligomerizációban is szerepe lehet (Cherney és mtsai. 2010).

Az *A. ambivalens* SqrE fehérje szekvenciaanalízise alapján a C-terminális szakasza rövidebb, mint az *A. aeolicus* SqrA enzimnek. A röntgenkristallográfiai eredmények során a C-terminális régió utolsó 53 aminosavát nem sikerült azonosítani (Brito és mtsai. 2009). Feltehetően egyetlen amfipatikus  $\alpha$ -hélix alkotja a C-terminális szakaszt (Cherney és mtsai. 2010). Bioinformatikai *in silico* modellezésekből számított adatok alapján ennek a hélixnek az utolsó 25 aminosava horgonyozza a fehérjét a membránba (Brito és mtsai. 2009).

A *C. maquilingensis* SqrC fehérjéje rövidebb C-terminálissal rendelkezik, mint ami az SqrA enzimekre jellemző. Két amfifil hélix alkotja a C-terminális régiót. Előállítottak kétféle deléciós mutáns SqrC-t, amelyeknél vagy csak a C-terminális felőli, vagy mindkét hélixet eltávolították. Ezeknek a variánsoknak a biokémiai kísérleti eredményei igazolták, hogy a C-terminális régióknak elengedhetetlen szerepe van a membránhoz való kötődésben, ugyanis mindkét esetben szolubilis fehérjét eredményeztek (Lencina és mtsai. 2020, 2013).

#### 1.4.4.4 Az SQR enzimek kinon kötőhelye

Az SQR enzimek kinon kötőhelye a C-terminális régióban abban a csatornában van, amely kapcsolatot teremt a fehérje felszíne és az aktív centrum FAD kofaktora között (Lencina és mtsai. 2013). A különböző SQR enzimek szekvenciaanalízise alapján megállapítható, hogy a C-terminális domén amfipatikus hélixének utolsó szakaszát főként hidrofób aminosavak alkotják. Az *A. ferrooxidans* és *A. aeolicus* SqrA, valamint a humán SqrB fehérjéket elektronakceptorral együtt sikerült kristályosítani és úgy modellezték őket, hogy a membránba

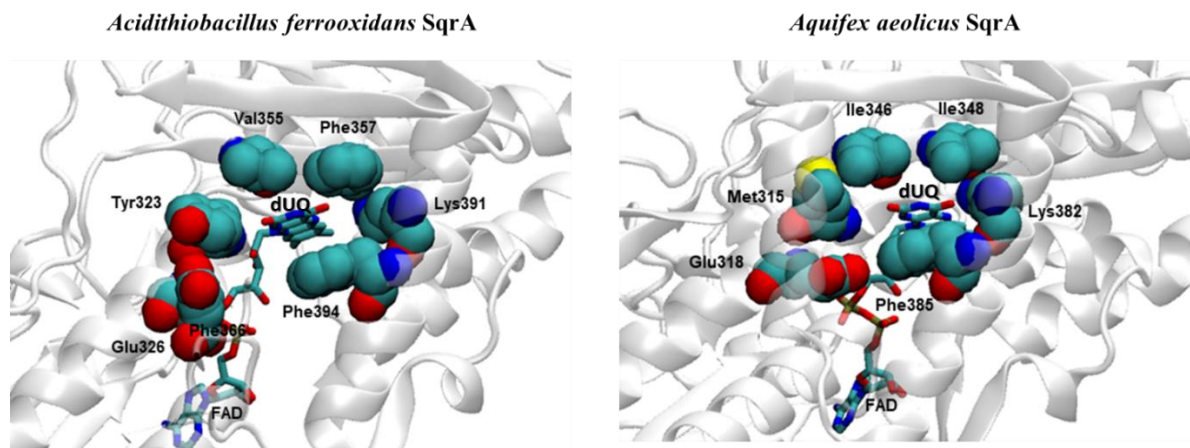
ágyazódnak. Ez a C-terminális domén amfipatikus héliceinek hidrofób régiói által valósul meg. A dUQ elektronakceptor poláris benzokinon feji csoportja mélyen a fehérje belsejébe kerül a kinon redukciós folyamat során, a hidrofób kinon kötőhelyre, a redukált FAD izoalloxazin gyűrűjének közelébe. A hidrofób oldallánc a molekula külső oldala felé mutat, ez a fehérjének az a része, amely a membránba illeszkedik (Lencina és mtsai. 2013; Cherney és mtsai. 2010).

Az *A. ferrooxidans* SqrA szerkezeti adatai alapján megállapították, hogy a dUQ benzokinon fej O4 atomja és a FAD izoalloxazin gyűrűjének O2 atomja között a távolság kevesebb, mint 3 Å. Ez a távolság elegendően rövid ahhoz, hogy az elektrontranszfer közvetlenül menjen végbe a FAD kofaktor és a kinon elektronakceptor között (Zhang és mtsai. 2016). A kinon kötőhelyen a dUQ aromás gyűrűjét két fenilalanin (Phe357, Phe394) és a Val354 fogja közre. Egyik vagy másik fenilalanin alaninra cserélése jelentős mértékben csökkentti (több, mint 90%-kal) a mutáns SqrA enzim katalitikus aktivitását a vad típusú enzimhez képest. Ha F357A és F394A mutációkat hoztak létre, akkor az teljesen inaktív fehérjét eredményezett (Zhang és mtsai. 2016). Tehát mindkét fenilalanin szerepe kiemelkedően fontos a kinon kötés szempontjából (Lencina és mtsai. 2020). A Lys391 és a Tyr411 feltehetően a kinon protonálásában játszik szerepet, ezek mind a kofaktorhoz, mind az elektronakceptorhoz kapcsolódnak (Cherney és mtsai. 2010). A Lys391 az oldalláncának aminocsoportjával (-NH<sub>2</sub>) hidrogénkötéssel kapcsolódik a FAD O4 atomjához (3,6 Å távolság), valamint szintén hidrogénkötéssel a dUQ O4 atomjához (4,5 Å távolság). Alaninra, glutaminsavra, aszparaginsavra cserélésével teljesen inaktív volt a fehérje (Zhang és mtsai. 2016). A Tyr411 szintén hidrogénkötésekkel kapcsolódik a FAD-hoz és a dUQ-hoz, alaninra cserélése pedig ugyanúgy egy inaktív fehérjét eredményezett, mint a Lys391 esetén (**12. ábra**) (Zhang és mtsai. 2016; Cherney és mtsai. 2010). A kevésbé konzervált Tyr323, az Asn353 és az Ile368 a dUQ decil oldalláncával lépnek kapcsolatba, a hidrofób zseb bejáratánál helyezkednek el. A Phe41, a Pro43, a Gly322 a kinon kötő csatorna további alkotói, a kinon redox fejcsoportjával alakítanak ki kölcsönhatást (Zhang és mtsai. 2016).

Az *A. aeolicus* SqrA fehérjében a dUQ szubsztráttal kristályosított szerkezet alapján a benzokinon gyűrűvel az egyik oldalon a Phe385, a másik oldalon az Ile346 lép kapcsolatba a kinon kötőhelyen a C-terminális régióban (Zhang és mtsai. 2016; Marcia és mtsai. 2009). A kinon redukció során a szubsztrát protonáltságában a Gln318-nak lehet szerepe, valamint a konzervált Lys382-nak is szerepe lehet a működésben (**12. ábra**) (Marcia és mtsai. 2009).

A *C. maquilingsis* SqrC esetén, az SqrA enzimek ismert szekvencia és szerkezeti adatai alapján a hidrofób Phe337 és Phe362, valamint a Lys359 vehet részt a kinon redukciós aktivitásban. Kísérleti eredmények alapján a Phe337 nélkülözhetetlen a katalízishez, alaninra

cserélésével inaktív az enzim. A Phe362 mutációjával (alaninra, tirozinra és triptofánra cserélték) kb. 85 %-kal csökken az aktivitás a vad típushoz képest. Az *A. ferrooxidans* SqrA enzimhez hasonlóan a konzervált Lys359 kapcsolódik a kofaktorhoz és a kinonhoz hidrogénkötésekkel, így lehet szerepe a kinon protonálásában. Míg a *C. maquilingensis* SqrC K359A mutáns aktivitása kb. 50%-ra csökkent, addig az *A. ferrooxidans* SqrA-ban ez a mutáció inaktivitást eredményezett (Lencina és mtsai. 2020).



**12. ábra:** Az *A. ferrooxidans* és *A. aeolicus* SqrA enzimek kinon kötőhelyeinek szerkezeti modellje dUQ kinon kötött formában

A kísérleti eredmények és szerkezeti vizsgálatok alapján megállapítható, hogy az SQR típusú fehérjék C-terminális régiójában a kinon kötőhelyet általánosan elágazó láncú apoláris, valamint aromás oldalláncú aminosavak alkotják, ami a dUQ benzokinon gyűrűt veszi körül a fehérjébe való belépését követően (Brito és mtsai. 2009). Ezek az aminosavak nagyon konzerváltak. Az *A. ferrooxidans* SqrA a legrészletesebben jellemzett fehérje, azonban a kinon kötőhelye nem az általánosabb formának felel meg, ugyanis itt két aromás aminosav fogja közre a kinon feji részét. A gyakoribb elrendezés az, hogy a dUQ benzokinon gyűrűjét egyik oldalon aromás aminosav, míg a másikon elágazó oldalláncú aminosav fogja közre. Azok az aminosavak, amelyek a dUQ decil oldalláncával lépnek kapcsolata az SQR enzimek között nagyon változatosak, kevésbé konzerváltak. Ennek az oka, hogy ezek a C-terminális régió amfipatikus héliceinek a flexibilis részén foglalnak helyet (Zhang és mtsai. 2016).

### 1.5 *Thiocapsa roseopersicina* BBS, a modellorganizmus

A fotoszintetikus baktériumok a növekedéshez fényenergiát hasznosítanak. Öt csoportjukat különböztetjük meg: Chloroflexus, zöld kénbaktériumok, cianobaktériumok,  $\alpha$ - és  $\beta$ -Proteobaktériumok és a heliobaktériumok (Hugenholtz és mtsai. 1998). A cianobaktériumok

vízbontással állítanak elő oxigént, az anaerob fotoszintetikus baktériumok pedig redukált kénvegyületeket, szerves vegyületeket hasznosítanak elektrondonorként.

A legősibb fotoszintetizálók a zöld és bíbor kénbaktériumok. A globális szén-dioxid megkötésében a szerepük jelenleg csekély, de egykoron jelentős mértékben hozzájárultak a szerves anyagok mennyiségének növekedéséhez a Földön. A zöld kénbaktériumok az elemi ként a sejten kívül, míg a bíbor kénbaktériumok a sejten belül halmozzák fel kénglobulusok formájában (Felföldi és mtsai. 2013).

A bíbor kénbaktériumok a *Chromatiaceae* és *Ectothiorodospiraceae* családokba sorolhatóak be a  $\gamma$ -*Proteobaktériumok* osztályán belül. A *Chromatiaceae* családban vannak a tipikus fajok, melyek szulfidot igényelnek, de tioszulfátot és hidrogént nem hasznosítanak, pl. a *Chromatium okenii*. A családon belül a nem tipikus fajok különféle szerves szubsztrátokat használnak, képesek redukált kén nélkül növekedni. A bakterioklorofill-a és -b mellett spirilloxantin, okenon vagy rhodopinál karotinoidok adják a színüket.

Kutatásaink modellorganizmusa a *T. roseopersicina*, mely egy Gram-negatív, fototróf, anaerob bíbor kénbaktérium a *Chromatiaceae* családon belül. Az Északi-tenger mélyebb rétegeiből, a 14 °C-os vízből izolálták (Gogotov és mtsai. 1978). Eredeti élőhelyének változó életkörülményei (pl. oxigén és/vagy kén mennyiségi változása, hőmérséklet stb.) miatt nagy alkalmazkodóképességgel rendelkezik (Visscher és mtsai 1990). Elektrondonorként H<sub>2</sub>S-t, tioszulfátot, elemi ként és molekuláris hidrogént hasznosít a fotolitoautotróf növekedés során. A *T. roseopersicina* sejtek nem mozgó, coccus (gömb, tojásdad vagy kerek) alakú baktériumok (Wu és mtsai. 2021). Rózsaszín színét a bakterioklorofillok mellett a spirilloxantin karotenoid adja (Kovacs és mtsai. 2003). Opálos jellegét a felhalmozott kénglobulusok eredményeznek (Madigan és Jung 2009). Optimális növekedési hőmérséklete 25-28 °C, tápfolyadékban 4-6 nap alatt l, szilárd táptalajon 14 nap alatt képződnek telepek. Fotoautotróf növekedése során elektrondonorként redukált kénvegyületeket használ, mint a szulfid, tioszulfát, elemi kén vagy poliszulfid (Faou és mtsai. 1990; Kondratieva és mtsai. 1976). Anaerob növekedése során nem termel oxigént, a fotoszintetikus apparátusból hiányzik a PSII komplex.

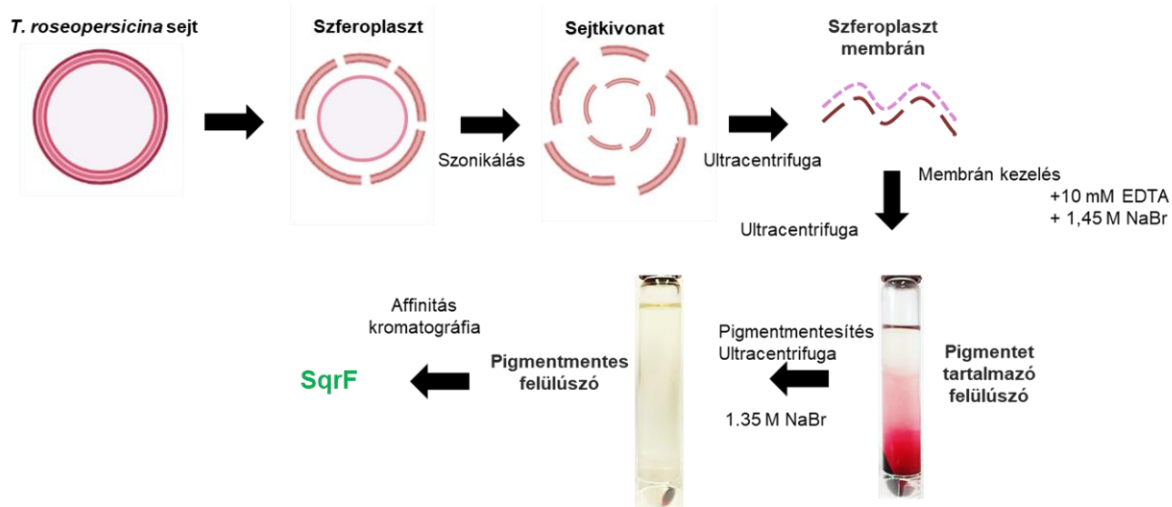
### **1.5.1 A *T. roseopersicina* szulfid oxidáló enzimjei**

Kutatócsoportunk korábbi eredményei alapján azonosította a *T. roseopersicina* genomjában három szulfid oxidálására képes enzim génjét: *fccAB*, *sqrD* és *sqrF* gének. Ezek a bíbor kénbaktériumokra általánosan jellemzőek. Az FccAB enzimet kutatócsoportunk másik tagja részben jellemezte (publikálás folyamatban), az SqrD fehérjét pedig nem sikerült kitisztítaniuk (Duzs és mtsai. 2018).



Annak ellenére, hogy számos organizmus rendelkezik SqrF enzimmal (például a *C. tepidum* zöld kénbaktérium (Shuman és Hanson 2016), az *R. capsulatus* fotoszintetikus nemkén baktérium (Ding és mtsai. 2014), az *A. ferrooxidans* nem fotoszintetikus baktérium (Valdes és mtsai. 2008)), annak szerkezetéről és működéséről igen kevés információval rendelkezünk.

Az SqrF enzimet a *T. roseopersicina*-ban, homológ rekombináns módon egy *sqrF* gént tartalmazó expressziós vektorról termeltetve sikerült előállítani. Az SqrF membránból való felszabadítására NaBr alkalmazásával és affinitás kromatográfiával történő tisztítására (az N-terminális régió Strep II-taggel fuzionáltatott) kutatócsoportunk korábban kidolgozott egy módszert, amelyet a 4.4 fejezet részletesen leír (13. ábra) (Duzs és mtsai. 2018).

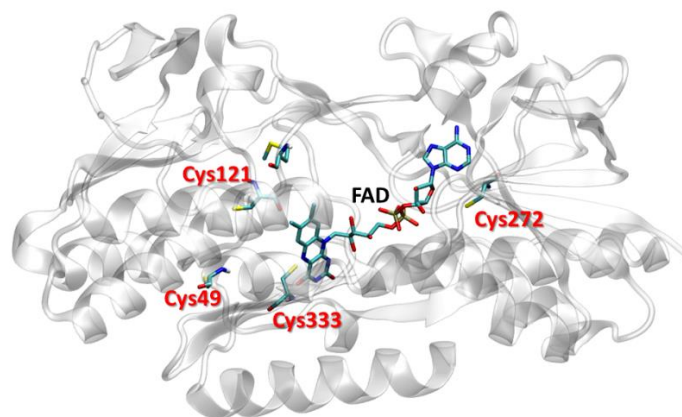


13. ábra: A *T. roseopersicina* SqrF enzim tisztítására kidolgozott módszer

Ezután munkatársaim jellemezték a tisztított SqrF fehérjét. A *T. roseopersicina* SqrF a különböző biokémiai mérések alapján tartalmaz FAD kofaktort, ami monomer, dimer és trimer formában is azonosítható volt. A *T. roseopersicina* SqrF FAD tartalma (~74%) hasonló a *C. tepidum* SqrF-hez (~75%) és az *A. ferrooxidans* SqrA-hoz (~72%) (Duzs és mtsai. 2018; Shuman és Hanson 2016; Zhang és Weiner 2014). Különböző kinon analógokkal, mint elektronakceptorokkal mérték az SqrF fehérje katalitikus aktivitását, mivel a különböző SQR fehérjék affinitása eltér a különböző kinonokhoz. Továbbá a fakultatív anaerob Proteobaktériumok membránjában mind az ubikinon, mind a menakinon típusú kinonok előfordulnak (Lencina és mtsai. 2013; Søballe és mtsai. 2008). A folyadékromatográfia tömegspektrometria mérési eredmények alapján a *T. roseopersicina* SqrF membránja mindkét típusú kinont tartalmazza (Duzs és mtsai. 2018). A kísérleti eredmények alapján az ubikinon típusú kinonokhoz, mint decilubikinon (dUQ) és durokinon (DQ) (10.4 melléklet) a legnagyobb az affinitása. A menakinon típusú kinonokkal nagyon alacsony aktivitásokat mértek. Ez a kinon preferencia figyelhető meg a többi vizsgált SQR esetében is (Chan és mtsai.

2009). Összességében a többi SQR enzimmel összehasonlítva a *T. roseopersicina* SqrF enzimmél jelentősen alacsonyabbak az aktivitás értékek. Munkatársaim ezenfelül vizsgálták a szulfidhoz való affinitást is, meghatározták a kinetikai paramétereket. Az eredmények szerint ennek az SqrF enzimnek a szulfidhoz való affinitása a többi SQR enzimhez képest magasabb tartományba esik, bár a *C. tepidum* SqrF-hez képest sokkal alacsonyabb. Ennek oka az lehet, hogy a szekvencia hasonlóság nagyon alacsony a két enzim között (Duzs és mtsai. 2018; Shuman és Hanson 2016). A reakció aktivációs energiáját is meghatározták mind DQ-val, mind dUQ-val. Mindkét esetben magasabb értékeket kaptak *T. roseopersicina* SqrF enzimmél a már korábban vizsgált *A. aeolicus* és *A. ferrooxidans* SqrA fehérjék aktivációs energiáinál. Ez arra utal, hogy a *T. roseopersicina* SqrF enzim katalitikus működése során több energiára van szükség, hogy végbe menjen a reakció, mint más SQR-ek esetén (Duzs és mtsai. 2018).

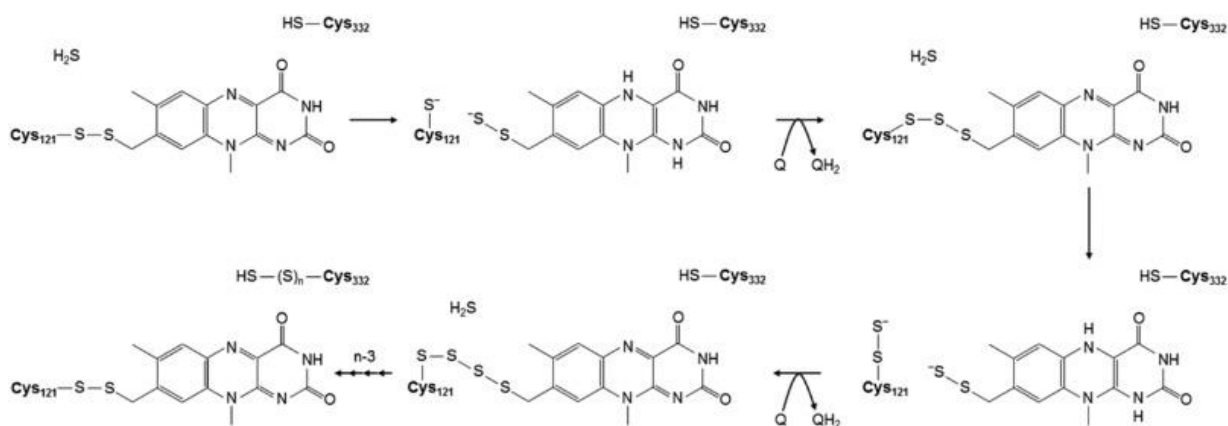
A *T. roseopersicina* SqrF szerkezetét kísérletes módszerekkel még nem határoztuk meg, de rendelkezünk egy *in silico* térszerkezeti homológia modellel, ami az *A. aeolicus* SqrA kristályszerkezte alapján lett előállítva (Duzs és mtsai 2021). Eszerint a *T. roseopersicina* SqrF fehérje aktív centrumában 4 darab cisztein található. Ezek közül kettő, különböző csoportokba tartozó SQR-ek között is konzervált cisztein (Cys121 és Cys332) az aktív centrumban, a FAD izoalloxazin gyűrűjének két oldalán helyezkednek el, egymástól távol. Az *A. aeolicus* SqrA Cys156, mely jelentősen konzervált, az SqrF enzimekből hiányzik. Ennek megfelelően a *T. roseopersicina* SqrF-ben nincsen diszulfid-híddal kapcsolódó redox aktív pár. A másik két cisztein (Cys49 és Cys272) az aktív centrumtól távol, a fehérje felszínéhez közel, a két ellentétes oldalon helyezkednek el (14. ábra). A Cys272 csak az SqrF enzimek között konzervált, míg a Cys49 csak a *T. roseopersicina* SqrF-ben van jelen. A jelentős szerkezetbeli változások miatt feltételezhető, hogy a katalitikus működés is eltér az eddig megismert működési mechanizmusoktól.



**14. ábra:** A *T. roseopersicina* SqrF homológia modellje a konzervált ciszteinek kiemelésével (piros) (Duzs és mtsai. 2021)

Kutatócsoportunkkal helyspecifikus mutagenezissel alaninra cseréltük a *T. roseopersicina* SqrF mind a négy konzervált ciszteinjét. Biokémiai kísérletekkel, kinetikai paraméterek meghatározásával vizsgáltuk a ciszteinek szerepét az SqrF enzimben cisztein pontmutáns enzimváltozatok jellemzésével (Duzs és mtsai. 2021). A kísérleti eredmények alapján a Cys121 esszenciális, a FAD kovalens kötésében játszik szerepet, ugyanis alaninra cserélésével nem tartalmaz kofaktort a fehérje. A kötés módját kísérletesen bizonyítottuk, mely során a vad típusú SqrF fehérjét szubsztrátjai mellett jódcetamid (szulfhidril csoportokat gátló) jelenlétében vagy hiányában inkubáltuk, majd vizsgáltuk a szulfid-függő kinon redukáló aktivitást. Ez alapján a FAD és a Cys121 közötti kovalens kötés képes felbomlani az aktivitás során, ami akkor tud megvalósulni, ha a FAD-ot kötő ciszteinnek a szulfid oxidálásában is szerepe van. A C332A aktivitása 15% körüli értéket adott a vad típusú enzimhez képest, a szubsztrátokhoz való affinitása nem változott, tehát a szulfid függő kinon redukáló működésben lehet szerepe, de nem nélkülözhetetlen. Vélhetően a kéntermék koordinálásában vesz részt. A C272A aktivitása is csökkent a kinonhoz való affinitás csökkenése mellett, mely alapján a FAD-kinon közti redox folyamatokban lehet szerepe.

A szerkezeti adatok és a biokémiai vizsgálatok eredményei alapján felállítottunk egy lehetséges katalitikus mechanizmus modellt (**15. ábra**) (Duzs és mtsai. 2021). A Cys121 perszulfid-híddal köti a FAD kofaktort, a belépő szulfid ezt támadja. A kofaktor C8M csoportja köti a szulfidot, így jön létre egy CTC komplex. Az elektronok FAD-ra kerülése után a Cys121 visszaköt a kofaktorhoz. A képződő polyszulfid lánc kétféle módon alakulhat ki. Az egyik alapján a Cys332 aminosavon épül a kéntermék, amely a továbbiakban koordinálja a kéntermék kijutását. A másik feltételezés szerint a termék a Cys121 és a FAD között épül, majd a megfelelő hossz elérését követően átkerül a Cys332-re és koordinálja annak kijutását.



**15. ábra:** A *T. roseopersicina* SqrF feltételezett katalitikus modellje (Duzs és mtsai. 2021)

## 2. Célkitűzések

A munka során célul tűztük ki a *Thiocapsa roseopersicina* VI. típusú szulfid kinon oxidoreduktáz enzim katalitikus működési mechanizmus pontos megismerését és a résztvevő aminosavak szerepének meghatározását. Ez az enzim az ősi, konzervált SQR fehérjék egy kevésbé ismert és jellemzett típusa. Az SQR fehérjék a legtöbb élő szervezetben megtalálhatóak a prokariótáktól az eukariótákig és számos élettani folyamatban kiemelkedő szerepet töltenek be. Ezért működésük mélyre ható vizsgálata nélkülözhetetlen az anyagcsere és fiziológias folyamatok teljeskörű megismeréséhez. Az SQR fehérjék működése során egy két lépésből álló reakció játszódik le, a szulfid oxidációja, valamint a kinon redukciója. Korábban a kutatócsoportunk már jellemezte a vad típusú *T. roseopersicina* SqrF enzimet biokémiai és molekuláris biológiai kísérletekkel. A konzervált ciszteinek vizsgálatával felállítottunk egy lehetséges katalitikus modellt a *T. roseopersicina* SqrF szulfid oxidációs szakaszára. Ebben a disszertációban a kinon redukció folyamatát, továbbá a C-terminális domén és a Glu163 funkcionális szerepét vizsgáljuk.

Mindezeket figyelembe véve doktori munkám konkrét célkitűzései a következők voltak:

- A *T. roseopersicina* SqrF kinon kötőhely és C-terminális régió tanulmányozása, az őket feltehetően felépítő aminosavak meghatározása korábbi irodalmi eredmények és strukturális bioinformatikai analízis alapján.
- A kinon kötésben résztvevő aminosavak pontmutánsainak létrehozása és tisztítása. Az SqrF enzimvariánsok spektroszkópiai és biokémiai jellemzése a kinon redukció folyamatában betöltött szerepük megismerésének érdekében.
- A *T. roseopersicina* SqrF C-terminális régió funkcionális szerepének feltárása. A C-terminális régió szerepének tanulmányozása a membránhoz való kötődésében és a katalitikus működésben.
- A konzervált Glu163 aminosav *T. roseopersicina* SqrF enzim katalitikus működésében betöltött lehetséges szerepének meghatározása. Ehhez Glu163 alanin, aszparaginsav, lizin, glutamin és szerin pontmutáns SqrF enzimeket termelő *T. roseopersicina* törzsek létrehozása, az SqrF fehérjék tiszta formában történő előállítása. Az enzimvariánsok biofizikai és biokémiai jellemzése.

### 3. Anyagok és módszerek

#### 3.1 Felhasznált baktériumok tenyésztése

##### 3.1.1 *Escherichia coli* törzsek növesztési körülményei

A munka során elkészített és felhasznált *E. coli* sejtvonalat (10.1 melléklet) Luria-Bertani (LB) agar táplemezen (LB tápoldat + 1,5 m/V% agar) növesztettük és tartottuk fent. Ezeket a felnövesztett baktérium telepeket 4 °C hőmérsékleten tároltuk a táplemezen. Az alkalmazott baktériumok nagy mennyiségű felszaporítása érdekében az *E. coli* törzsek folyadék sejt kultúráit steril, papírdugós Erlenmeyer lombikban, 30 mL LB tápoldatban, 37 °C hőmérsékleten, 160 rpm sebességű folyamatos horizontális rázatás mellett növesztettük (Ausubel és mtsai. 1994). A tápoldatokban és táplemezekben szelekciós célra a növesztett törzsek igényeinek megfelelően ampicillint 100 µg/µL, valamint kanamicint 25 µg/µL koncentrációban alkalmaztunk.

LB tápoldat összetétele: 10 g/L NaCl, 10 g/L tripton, 5 g/L élesztő kivonat.

##### 3.1.2 Tenyésztési körülmények *T. roseopersicina* törzsekhez

A vad típusú és mutáns SqrF fehérjéket termelő *T. roseopersicina* sejteket csiszolt dugós Erlenmeyer lombikban vagy táplemezen Pfennig-féle (PC) tápoldatban, illetve fitagéllel (Sigma) szilárdított standard számláló táptalaj (PCA [Plate Count Agar]) táplemezen, 25-28 °C hőmérsékleten, mikroanaerob környezetben, hagyományos wolframszál izzókkal (Tungsrám) való folyamatos megvilágítás mellett, 4-5 napig növesztettük. A tápoldatokban és táplemezekben szelekciós célra a sztreptomycin, gentamicin és kanamicin antibiotikumokat 25 µg/µL koncentrációban alkalmaztam.

PC tápoldat összetétele: 20 g/L NaCl, 1 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g/L MgCl<sub>2</sub>, 1 g/L KCl, 1 g/L NH<sub>4</sub>Cl, 2 g/L NaHCO<sub>3</sub>, 4 g/L Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 20 µL/L B<sub>12</sub> vitamin (1 mg/mL), 1 mL/L 20 mM Fe-EDTA, 1 mL/L mikroelem oldat.

Mikroelem oldat összetétele: 2975 mg/L Na<sub>2</sub>-EDTA, 300 mg/L H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub>, 200 mg/L CaCl<sub>2</sub>·6 H<sub>2</sub>O, 100 mg/L ZnSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O, 30 mg/L MnCl<sub>2</sub>·4 H<sub>2</sub>O, 30 mg/L Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2 H<sub>2</sub>O, 20 mg/L NiCl<sub>2</sub>·6 H<sub>2</sub>O, 10 mg/L CuCl<sub>2</sub>·2 H<sub>2</sub>O (Pfennig és Trüper 1992).

PCA táplemez összetétele: 18 g/L NaCl, 1 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g/L MgCl<sub>2</sub>, 1 g/L KCl, 1 g/L NH<sub>4</sub>Cl, 2 g/L NaHCO<sub>3</sub>, 2 g/L C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>, 2 g/L Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 7 g/L Phyta gél, 20 µL/L B<sub>12</sub> (1000 µg/mL), 1 mL/L mikroelem oldat, 1 mL/L 20 mM Fe-EDTA.

## 3.2 Baktériumok transzformálása

### 3.2.1 Kompetens *E. coli* sejtek készítése

Az Inoue et al., 1990 által leírt protokolt követtük. Az XL-1 NovaBlue és S17-1 λpir *E. coli* sejteket (**10.1 melléklet**) 50 mL tápanyagokban gazdag (SOB) tápoldatban, 18 °C hőmérsékleten, 150 rpm sebességű rázatás mellett növesztettük  $OD_{600nm} = 0,4-0,6$  értékig. Majd a kultúrákat 10 percig jégen hűtöttük, ezután centrifugáltuk (2500×g, 10 perc, 4 °C). A felülúszót leöntve, a sejteket jégen tartva 16 mL magas szénforrás tartalmú gazdag tápoldatban/Terrific Broth (TB) pufferben felszuszpendáltuk és ismét centrifugáltuk (2500×g, 10 perc, 4 °C). Majd a leülepített sejteket 4 mL TB pufferben szuszpendáltuk fel. A sejtuszuspenzióhoz 300 μL DMSO-t adtunk és a mintát 10 percig jégen inkubáltuk. Ezután a kezeléssel létrehozott kompetens sejtek szuszpenziójából 100 μL térfogatú egységeket jégen előhűtött 1,5 mL térfogatú mikrocentrifugacsövekbe mértük és folyékony nitrogénben lefagyasztottuk. A kompetens sejt mintákat -80 °C hőmérsékleten tároltuk. A sejtek kompetencia értékét (transzformációs hatékonyság) ismert mennyiségű plazmid transzformálása után felnőtt telepek száma alapján határoztuk meg.

TB puffer összetétele: 10 mM PIPES, 5 mM  $CaCl_2$ , 250 mM KCl, 55 mM  $MnCl_2$ , pH = 6,70.

SOB tápoldat összetétele: 0,5 g/L NaCl, 20 g/L tripton, 5 g/L élesztő kivonat.

### 3.2.2 *E. coli* sejtek transzformálása

A 3.2.1 fejezetben leírtaknak megfelelően elkészített és tárolt, a felhasználás előtt jégen tartva felolvasztott 100 μL térfogatú *E. coli* kompetens (**10.1 melléklet**) sejtuszuspenziókhöz adtuk hozzá a sejtekbe bejuttatandó DNS mintát, amely után 15 percig jégen tartottuk az elegyeket. Ezt követően a mintákat 42 °C hőmérsékletű vízfürdő termosztátban 55 másodpercig hőkezeltük. Jégre helyezéssel lehűtöttük a sejtuszuspenziókat, ami után 900 μL glükózzal kiegészített gazdag (SOC) tápoldatot és 8 μL 50% glükóz oldatot adtunk az *E. coli* sejtmintákhoz. A DNS-sejt elegyet 37°C hőmérsékletet biztosítva 500 rpm sebességgel 1 órán át ráztuk. Végül a sejteket a megfelelő antibiotikummal kiegészített LB agar lemezre szélesztettük ki.

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

### 3.2.3A *T. roseopersicina* sejtek konjugálása

A különböző pontmutációkat tartalmazó *sqrF* géneket hordozó expressziós vektorokat (pDSQNNV331A stb.) a kompetens S17-1  $\lambda$ pir *E. coli* sejtekbe (10.1 melléklet) transzformáltuk, majd PCR-rel ellenőriztük (4.3.3 fejezet), hogy a megfelelő antibiotikummal kiegészített táplemezen felnőtt telepek valóban tartalmazzák a bejuttatni kívánt DNS szakaszt. A donort, vagyis mobilizálandó plazmidot tartalmazó konjugációt elősegítő S17-1  $\lambda$ pir *E. coli* sejteket a megfelelő antibiotikum mellett LB tápoldatban  $OD_{600nm}=0,6$  értékig növesztettük 37°C hőmérsékleten, 160 rpm sebességű folyamatos horizontális rázatás mellett. A mutáns *sqrF* gént hordozó plazmidokat konjugációval juttattuk az S17-1  $\lambda$ pir *E. coli* sejtekből *T. roseopersicina* FOQRON sejtekbe (10.1 melléklet) (melyekből hiányzik az *sqrD*, *sqrF* és *fccAB* gén). A recipiens *T. roseopersicina* FOQRON sejteket a megfelelő antibiotikum jelenlétében az általánosan alkalmazott növesztési körülmények között (lásd 4.1.2 fejezet)  $OD_{600nm}=1,8$  értékig felnövesztettük. A felnőtt sejt kultúrákat centrifugáltuk (4700×g, 10 perc, 4 °C). A felülúszó eltávolítását követően a sejteket 4-4 mL PC tápoldatban felfuszpendáltuk. Ezután centrifugáltuk (4700×g, 10 perc, 4 °C). Ezt a lépést még egyszer megismételtük a tápoldat és az alkalmazott antibiotikumok teljes eltávolítása érdekében. Majd 100-100  $\mu$ L, úgynevezett Thiocapsa sóoldatban szuszpendáltuk fel a sejteket. A kapott *E. coli* (donor) és *T. roseopersicina* (recipiens) sejteket elegyítettük és az egész szuszpenziót a konjugációs táptalaj közepére cseppentettük. Amint felszívódott a csepp, a lemezt aerob körülmények között, megvilágítva, 28°C hőmérsékleten, éjszakán át inkubáltuk. Másnap a sejteket steril fogpiszkáló segítségével összegyűjtöttük a lemez felszínéről és 1 mL Thiocapsa sóoldatban szuszpendáltuk fel. Logaritmikus, 10×-es hígítási sort készítettünk, majd a különböző koncentrációjú oldatokból 100-100  $\mu$ L mennyiséget szélesztettünk ki megfelelő antibiotikumot tartalmazó szelekciós lemezre (PCA) (Fodor és mtsai. 2001). A lemezeket Oxoid AnaeroGen (N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>) anaerobizáló rendszerrel oxigénmentesített, átlátszó falú, gázbiztosan lezárható tároló edényben (Oxoid AnaeroJar, Thermo Scientific) inkubáltuk 14 napon keresztül, 28°C-on, folyamatos megvilágítás mellett. Így létrehoztuk az FRNSQNNV331A, FRNSQNNV331F, FRNSQNNI333A, FRNSQNNI333F, FRNSQNNF366A, FRNSQNNF366Y, FRNSQNNCTD, FRNSQNNV331AI333A, FRNSQNNV331AF366A, FRNSQNNI333AF366A, FRNSQNNV331AI333AF366A, FRNSQNNE163A, FRNSQNNE163D, FRNSQNNE163K, FRNSQNNE163Q, FRNSQNNE163S *T. roseopersicina* rekombináns SqrF enzimet termelő törzseket.

Thiocapsa sóoldat összetétele: 20 g/L NaCl, 1 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g/L MgCl<sub>2</sub>, 1 g/L KCl.

Konjugációs táptalaj összetétele: 18 g/L NaCl, 1 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g/L MgCl<sub>2</sub>, 1 g/L KCl, 1 g/L NH<sub>4</sub>Cl, 2 g/L NaHCO<sub>3</sub>, 2 g/L C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>, 2 g/L Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 2 g/L Nutrient Broth (Sigma-Aldrich), 1,5 %, 20 µL/L B12 (1000 µg/mL), 1 mL/L mikroelem oldat, 1 mL/L 20 mM Fe-EDTA.

### **3.3 DNS módosítással kapcsolatos technikák**

#### **3.3.1 Plazmid DNS tisztítása *E. coli* sejtekből**

A sejtekből történő plazmid DNS izoláláshoz *E. coli* sejt kultúrát megfelelő antibiotikummal kiegészített LB agar táplemezen felnevesztett baktérium telepéből oltottuk le 30 mL LB tápoldatban a megfelelő ampicillin vagy kanamicin antibiotikummal kiegészítve. A baktérium kultúrát egy éjszakán át, 37 °C hőmérsékleten, 160 rpm sebességgel vízszintes irányban rázatva növesztettük. Plazmid DNS tisztításhoz a GeneJet Plazmid Miniprep Kit-et (Thermo Scientific) alkalmaztuk. A tisztítani kívánt vektor DNS kópiaszámának megfelelően, 4,5 mL, illetve 30 mL sejt kultúrában levő sejteket több lépéses centrifugálással gyűjtöttük össze 1,5 mL térfogatú mikrocentrifugacsövekbe (4700×g, 1 perc, 4 °C). A kiülepedett sejteket 250 µL, hűtött (4 °C) szuszpendáló oldatban vettük fel, mely RNáz enzimet tartalmazott. Ezután a mintákhoz 200 µL lízis puffert adtunk, majd forgatással homogenizáltuk az elegyeket. A következő lépésben 350 µL neutralizáló oldatot mértünk a sejtekre, majd óvatos keverés és centrifugálás (16800×g, 5 perc, 4 °C) után a plazmid DNS-t tartalmazó feltisztult felülúszóval dolgoztunk tovább. Az alkalmazott DNS-kötő oszlopot 500 µL oszlop előkészítő oldattal kezeltük, amelyet centrifugálással távolítottunk el teljes mértékben (16800×g, 1 perc, 4 °C). A sejt lizátumból 750 µL mennyiséget mértünk a DNS-kötő oszlopra, amit centrifugálással folytattunk át az oszloptölteten (16800×g, 1 perc, 4 °C) a plazmid molekulák szilika oszlopra kötődésének érdekében. A következőkben kétszer ismételt mosás lépésben 500 µL mosó pufferrel és centrifugálással (16800×g, 1 perc, 4 °C) távolítottuk el a nem specifikusan kötődő anyagokat. Az oszlopra felkötődött plazmid DNS-t két lépésben, 20 – 20 µL ultratiszta ioncserélt vízzel választottuk le az oszloptöltetről és centrifugálással vontuk ki a DNS-tisztító oszlopból (16800×g, 2 perc, 4 °C). Az izolált plazmid DNS minta koncentrációját és tisztaságát NanoDrop™ 1000 Spektrofotométer (Thermo Scientific) segítségével határoztuk meg és agaróz gélelektroforézis módszerrel ellenőriztük a minőségét.

#### **3.3.2 Agaróz gélelektroforézis**

A tisztított lineáris DNS minták, a PCR termékek és a restrikciós emésztésekkel létrehozott DNS fragmentumok megfelelő méretét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük. Az alkalmazott 1% agarózt tartalmazó gélt 0,1 µg/mL koncentrációjú etídium-bromiddal



egészítettük ki. A különböző mintákat TAE (Tris-Acetát-EDTA) pufferben 90 V feszültséggel futtattuk 25 percig.

TAE puffer összetétele: 4 mM Tris-acetát, 1 mM EDTA, pH=8,00.

### **3.3.3 Polimeráz láncreakciók**

A PCR elegyek összetétele, melyeket ellenőrzés céljából alkalmaztunk 20  $\mu$ L végtérfogatban: 200  $\mu$ M dNTP, 10 $\times$  hígított DreamTaq Green puffer, 125-125 ng az indítoszekvencia párok tagjaiból. Ezen felül DreamTaq (Thermo Scientific) polimeráz enzimet, valamint templátként tisztított plazmidot vagy *E. coli* kolóniából készített sejtszuszpenziót használtunk a reakcióelegyekben. A program 3 perc 95 °C hőmérsékletű denaturációs lépéssel kezdődik, ezt követik: 30 másodperc 95 °C, 20 másodperc 55 °C, 1 perc 72 °C lépések, 30 cikluson keresztül ismételve. A reakció program utolsó lépéseként egy 5 perc 72 °C hőmérsékletű záró DNS szintézis lépést alkalmaztunk az esetleges nem teljes szálak kiegészítése érdekében.

### **3.3.4 DNS végek módosítási eljárásai**

A helyspecifikus DNS hasításokat restriktív endonukleáz enzimekkel, a 3'- és 5'- irányban egyes szálú túlnyúló végeket tartalmazó DNS fragmentumok tompítását dNTP jelenlétében T4 és Klenow polimerázzal (Fermentas) a gyártó útmutatásai alapján végeztük. Az alkalikus foszfatáz és polinukleotid kináz kezeléseket az enzimeknek a Fermentas cég által forgalmazott „Fast Digest” típusú variánsaival végeztük a Fast Digest Green puffer (Fermentas) által biztosított közegben, a gyártó útmutatásai alapján.

### **3.3.5 Ligálás**

A ligálás reakciókhoz T4 DNS ligáz enzimet (Fermentas) használtunk. A reakcióelegyeket Rapid Ligáz Puffer alkalmazásával állítottuk össze. A beépítendő DNS fragmentumot kétszeres mennyiségben adtuk a megfelelő hasítással és kezeléssel vele kompatibilis végűvé tett expressziós vektor fragmentumokhoz. A ligálásokat a gyártó útmutatásai alapján végeztük el, 30 percig vagy 1 órán át 22 °C-on inkubálva az elegyeket. Ezt követően agaróz gélelektroforézis módszerrel (3.3.2 fejezet) ellenőriztük a ligálási termékeket.

### **3.3.6 DNS fragmentum izolálás**

Az agaróz gélelektroforézist (3.3.2 fejezet) követően a gél megfelelő DNS szakaszt tartalmazó darabját kivágtuk, 1,5 mL térfogatú Eppendorf csőbe helyeztük és a tömegét meghatároztuk. A gélből történő DNS izolálást a GeneJET Gel Extraction Kittel (Thermo

Scientific) végeztük. A kivágott géldarabhoz a tömege háromszorosának megfelelő térfogatú kötő (Binding) puffert adtunk (1 egység gél: 100 mg=100  $\mu$ L), majd 55 °C hőmérsékleten inkubáltuk a géldarab teljes feloldódásáig. Ezután hozzáadtunk egy gélterfogatnyi mennyiségű izopropanolt. A DNS-kötő oszlopot 500  $\mu$ L oszlop előkezelő oldattal mostuk, amelyet centrifugálással távolítottunk el teljes mértékben (16800 $\times$ g, 1 perc, 4 °C), majd a feloldott agaróz gél mintát az oszlopra mértük és centrifugáltuk (16800 $\times$ g, 1 perc, 4 °C). A nem specifikusan kötődő anyagokat kétszer ismételt lépésben távolítottuk el 700  $\mu$ L mosó puffer oszlopra mérésével és centrifugálással (16800 $\times$ g, 1 perc, 4 °C). Az oszlopra felkötődött DNS molekulákat két lépésben, 20 – 20  $\mu$ L steril, ioncserélt víz hozzáadásával és centrifugálással (16800 $\times$ g, 1 perc, 4 °C) eluáltuk.

### 3.3.7 Nukleotidsorrend meghatározása

A DNS szekvenciák meghatározása Sanger-féle automata kapilláris szekvenálás módszerrel készült a megfelelő specifikus oligonukleotidok használatával (Eurofins Genomics [Germany]) (Sanger és mtsai. 1977).

### 3.3.8 Helyspecifikus mutagenézis

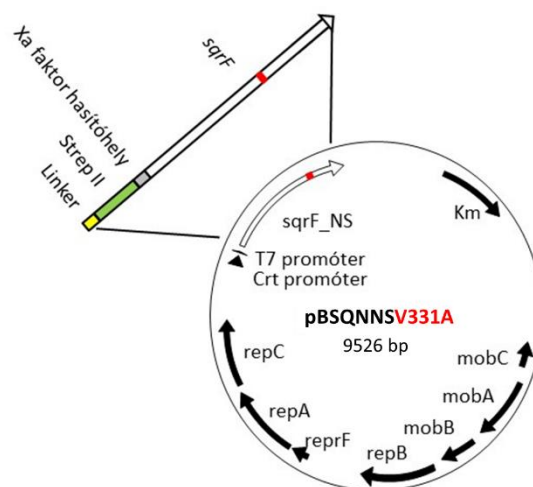
A pontmutáns SqrF fehérjét kódoló géneket a korábban elkészített pBluescript SK+ vektorba épített vad típusú *sqrF* génből (pBSQNNS) (**10.2 melléklet**) hoztuk létre irányított helyspecifikus mutagenézissel (Duzs et al. 2018). A plazmidban az *sqrF* gén 3' végéhez StrepII affinitás peptidet kódoló DNS fragmentum van fuzionáltatva. Ez a nyolc aminosavból álló oligopeptid a későbbiekben a rekombináns SqrF fehérje N-terminális végén fog megjelenni. A mutáns DNS fragmentum szintetizáló reakcióelegy összetétele és az összetevők koncentrációja 50  $\mu$ L végtérfogatban: 20 ng templát pBSQNNS vektor DNS, 125-125 ng a megfelelő mutációt hordozó indítószekvencia párokból, 200  $\mu$ M dNTP, 5  $\mu$ L 10 $\times$  koncentrált Phusion HF puffer, valamint 2,5 U Phusion DNS polimeráz. Az *in vitro* DNS szintézis reakció lépései: 15 másodperc 95 °C denaturációs lépés, ezt követi három lépés (30 másodperc 95 °C, 1 perc 55 °C, 6 perc 72 °C), amelyek 16 cikluson keresztül voltak ismételve.

Indítószekvencia párok: onV331AF-onV331AR, onV331FF-onV331FR, onI333AF onI333AR, onI333FF-onI333FR, onF366AF-onFF366AR, onF366YF-onF366YR, onCTDF onCTDR, onV331AI333AF-onV331AI333AR, onV331AF366AF-onV331AF366AR, onI333AF366AF-onI333AF366AR, onV331AI333AF366AF-onV331AI333AF366AR, onE163AF-onE163AR, onE163DF-onE163DR, onE163KF-onE163KR, onE163QF-onE163QR, onE163SF-onE163SR (**10.3 melléklet**).

A reakcióban keletkező termékeket a reakcióelegyhez adott 10 U/  $\mu$ L DpnI enzimmel emésztettük 1 órán át, 37 °C hőmérsékleten. Ez az endonukleáz csak a metilált DNS szálakat hasítja, így a pontmutációt hordozó újonnan szintetizált szálak érintetlenek maradnak. A restriktív endonukleázzal kezelt reakcióelegyet végül *E. coli* XL-1 NovaBlue kompetens sejtekbe (10.1 melléklet) transzformáltuk és szélesztettük ampicillin tartalmú táplemezre. A felnőtt telepek közül a mutáns *sqrF* gént hordozó sejteket tartalmazókat a mutáns DNS szekvenciára és vektor DNS-re specifikus oligonukleotid párral végzett PCR reakcióval azonosítottuk (3.3.3 fejezet) (onV331AE, onV331FE, onI333AE, onI333FE, onF366AE, onF366YE, onCTDE, onV331AI333AE, onV331AF366AE, onI333AF366AE, onV331AI333AF366AE, onE163AE, onE163DE, onE163KE, onE163QE, onE163SE) (10.3 melléklet). A vártnak megfelelő méretű sejt vonalakat folyadékban, megfelelő szelekció mellett leoltottuk, majd plazmid DNS-t tisztítottunk és a konstrukciókat szekvenálással ellenőriztük, hogy adott helyen hordozza-e, illetve, hogy máshol nem tartalmaz-e mutációt a génszekvencia (pBSQNNV331A, pBSQNNV331F, pBSQNNI333A, pBSQNNI333F, pBSQNSF366A, pBSQNSF366Y, pBSQNSCTD, pBSQNSV331AI333A, pBSQNSV331AF366A, pBSQNNI333AF366A, pBSQNSV331AI333AF366A, pBSQNSE163A, pBSQNSE163D, pBSQNSE163K, pBSQNSE163Q, pBSQNSE163S) (10.2 melléklet).

### 3.3.9 Pontmutáns SqrF fehérjék termelését biztosító expressziós vektorok előállítása

A különböző pontmutációkat tartalmazó *sqrF* géneket hordozó, azok kifejeződését biztosító expressziós vektorok létrehozása helyspecifikus mutagenézissel történt a pBSQNNV331A vektoron (15. ábra).



16. ábra: *T. roseopersicina* SqrF fehérje mutáns termelő expressziós vektor sematikus ábrája

Annak érdekében, hogy a megváltoztatott génszakaszt a pDSK6CrtKm expressziós vektorba (**10.2 melléklet**) építsük, az adott helyspecifikus mutációt hordozó *sqrF* gént tartalmazó vektort (**16. ábra**) *Hind*III restrikciós endonukleázzal hasítottuk. Az emésztést követően keletkező 5' túlnyúló végeket Klenow polimerázzal feltöltöttük. A vektorokat *Nde*I restrikciós endonukleázzal emésztettük. A pDSK6CrtKm expressziós vektort *Pst*I restrikciós enzimmel hasítottuk meg. A tompa végek létrehozásának az érdekében T4 DNS ligázzal töltöttük fel a túlnyúló részeket. Ezután *Nde*I endonukleázzal hasítottuk a vektort, ami szintén ragadós végeket eredményezett. Ezután alkalikus foszfátáz kezelést alkalmaztunk a hasított vektorokon, az önligálás elkerülése érdekében. A pontmutációt hordozó *sqrF* gént tartalmazó DNS szakaszt fragmentum izolálással (3.3.6 fejezet) elválasztottuk, majd a hasított és kezelt pDSK6CrtKm vektorral ligáltuk (pDSQNNV331A, pDSQNNV331F, pDSQNNI333A, pDSQNNI333F, pDSQNNF366A, pDSQNNF366Y, pDSQNNCTD, pDSQNNV331AI333A, pDSQNNV331AF366A, pDSQNNI333AF366A, pDSQNNV331AI333AF366A, pDSQNNSE163A, pDSQNNSE163D, pDSQNNSE163K, pDSQNNSE163Q, pDSQNNSE163S) (**10.2 melléklet**). Ezt a reakcióelegyet *E. coli* NovaBlue kompetens sejtekbe (**10.1 melléklet**) transzformáltam. A rekombináns vektort tartalmazó transzformált *E. coli* sejteket kolónia PCR módszerrel (3.3.3 fejezet) azonosítottuk az expressziós vektorra és a mutáns DNS szekvenciára specifikus indítoszekvenciákkal. Az azonosított sejtvonalakból plazmidot izoláltunk, majd ezt követően az expressziós vektor konstrukciók pontos szekvenciáit szekvenálással ellenőriztük.

### **3.4 Fehérjetermeltetés és tisztítás**

#### **3.4.1 Vad típusú és mutáns SqrF fehérjét termelő *T. roseopersicina* sejtmembrán frakció előállítása**

A 3.1.2 fejezet növesztési körülményei alapján a *T. roseopersicina* sejteket 5 darab 2,5 liter űrtartalmú csiszolt dugós Erlenmeyer lombikban felszaporítottuk. A sejtek a leoltást követő 5. napon kerültek felhasználásra. A felnőtt sejt kultúrákat centrifugálással (8300×g, 10 perc, 4 °C) elválasztottuk a tápoldattól. Ezt követően a mintákat TBSSL (Tris-sel pufferelt sóoldat szacharózzal és lizozimmal kiegészítve) oldatban szuszpendáltuk fel, majd 30 °C-on, 30 percig inkubáltuk, 160 rpm sebességgel horizontális rázatással. A szuszpenzióhoz az alkalmazott TBSSL oldattal megegyező térfogatú 4 °C hőmérsékletű steril vizet adtunk és 10 percig jégen tartottuk. A kezelés eredményeként a sejtekből létrejött szferoplasztokat a periplazma tartalmú felülúszótól centrifugálással (13700×g 10 perc, 4 °C) választottuk el. A szferoplasztokat 20 mL TBS pufferben (pH=8,00) felszuszpendáltuk, majd Bandelin Sonopuls

HD4100 típusú ultrahangos szonikátorral (Berlin, Germany) tártuk fel VS 200/T szonikáló fej használatával (85%-os amplitúdóval, 15 másodperces ultrahang kezelést alkalmazva 8 cikluson keresztül, amely lépések között 10 másodperces várakozási időt hagyunk). A mintákat jeges vízben hűtöttük a kezelés során, azok felmelegedésének elkerülése érdekében. Egyszerre 20 mL sejt szonikálására volt lehetőség, a program során 6500-7000 kJ volt a leadott összenergia. A fel nem tárodott sejteket, sejtfalmaradványokat, kénkristályokat centrifugálással (27000×g, 15 perc, 4 °C) választottuk el. Az így tisztított, feltárt sejteket tartalmazó felülúszót Sorvall WX Ultra Series 90 típusú ultracentrifuga és T-1270 típusú rotor (ThermoFisher Scientific) felhasználásával 100000×g, 90 perc, 4 °C programmal centrifugáltuk 10 mL térfogatú Oak Ridge típusú PC/PP ultracentrifuga csövekben. A membránfrakciónak megfelelő leülepitett minta tömegét meghatároztuk, 30 mL TBS pufferben (pH=8,00) szuszpendáltuk fel és tároltuk -20 °C-on a membrán kezeléséig.

TBS oldat összetétele: 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl pH=8,00.

TBSSL oldat összetétele: TBS, 25% szacharóz, 0,1% lizozim.

### **3.4.2 Az izolált sejtmembránból történő fehérjefelszabadítás nátrium-bromid kezeléssel**

A felolvasztott 0,12 g/mL koncentrációjú membrán frakciót 10 µM EDTA (pH=8,00) pufferrel rázattuk 160 rpm sebességgel 30 percig 25 °C-on. Ezt követően nátrium-bromid oldattal egészítettük ki a sejtmembrán mintát 1,45 M végkoncentrációra, majd további 1 órán át inkubáltuk a korábbival megegyező körülmények között (Duzs és mtsai. 2018). Az elegyet Sorvall WX Ultra Series 90 típusú ultracentrifuga és T-1270 típusú rotor (ThermoFisher Scientific) segítségével 200000×g, 120 perc, 4 °C programmal centrifugáltuk 10 mL térfogatú Oak Ridge típusú PC/PP ultracentrifuga csövekben a felszabadított fehérjéknek a kezelt membrántól való elválasztása érdekében. A keletkezett, felszabadított membránfehérjéket tartalmazó felülúszót felhasználásig -20 °C-on tároltuk.

### **3.4.3 SqrF fehérje tisztítás affinitás kromatográfiás módszerrel**

A felszabadított membránfehérjéket tartalmazó felülúszót affinitás kromatográfiás módszerrel tisztítottuk. A gravitációs átfolyó oszlopot TBS pufferrel (pH=8,00) kétszer-háromszor átöblítettük, majd belemértük az oszloptöltetet (Strep-tactin Superflow 50% szuszpenzió, IBA). Ezt TBS pufferrel (pH=8,00) háromszor-négyszer átmostuk annak érdekében, hogy eltávolítsuk a glicerint és az esetleges szennyeződések. A felszabadított membránfehérje mintához kevertük az oszloptöltetet, majd 1 órán át inkubáltuk 25°C-on,

folyamatos forgatás mellett. Az átfolyó összegyűjtése után az oszlopot az oszloptöltet térfogatának kétszeresével megegyező mennyiségű TBS pufferrel (pH=8,00) mostuk 8 lépésben. Ennek a célja, hogy a nem specifikusan kötődő fehérjék lemosódjanak az oszlopról. Az oszlophoz kötődött Strep tag II peptidet tartalmazó fúziós fehérjéket négy lépésben, fél oszloptöltet térfogatnak megfelelő mennyiségű elúciós pufferrel választottuk le az oszloptól. Végül az oszlopot háromszoros oszloptérfogatnyi regeneráló oldattal kezeltük. A regeneráló oldatot lúgos pH-jú TBS pufferrel (pH=10,10) távolítottuk el, háromszor-négyszer átmosva az oszlopot, addig amíg az oszlop újra teljesen színtelenné nem vált. TBS pufferrel (pH=8,00) háromszor átmostuk az oszlopot, hogy visszaállítsuk a pH=8,00 értéket. Az újra felhasználható oszlopot 1 mL TBS pufferrel borítva, 4 °C hőmérsékleten tároltuk a következő felhasználásig.

Elúciós puffer összetétele: 100 mM Tris-HCl pH=8,00, 150 mM NaCl, 2,5 mM desthiobiotin.

Regeneráló puffer összetétele: 100 mM Tris-HCl pH=8,00, 150 mM NaCl, 1 mM HABA (hidroxil-azofenil-benzoidsav).

### **3.5 Fehérjeanalitikai módszerek**

#### **3.5.1 Fehérje mennyiségének meghatározása Micro-Lowry módszerrel**

A fehérje mintákat 800 µL 0,25 M NaOH oldatban oldottuk fel, majd 20 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten. Ezután 300 µL C reagenst adtunk az elegyhez. Kevertetés után 25 °C-on inkubáltuk 15 percig. Majd 100 µL 72% Folin reagenst adtunk hozzá, és 30 percen át folytattuk az elegy inkubálását szobahőmérsékleten. Végül megmértük a minta oldatok 750 nm hullámhosszúságú fényelnyelő képességét SmartSpec 3000 spektrofotométerrel (BioRad).

Az ismeretlen minták fehérje koncentrációját a reakcióelegyek fényelnyelésének különböző koncentrációjú borjú szérum albumin kalibrációs referencia minták 750 nm hullámhosszúságú fényelnyelése alapján állapítottuk meg (Yeang és mtsai. 1998).

C reagens összetétele: 6% NaHCO<sub>3</sub>, 15% CuSO<sub>4</sub>, 3% Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> keverék 50:1 arányú elegye.

#### **3.5.2 Denaturáló poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE)**

A fehérjeminták molekulatömeg szerinti elválasztására SDS-PAGE módszert használtunk. 1,5 mm vastagságú, SDS-gyűjtő gélből és 12% koncentrációjú SDS-szeparáló gélből álló denaturáló poliakrilamid gélt készítettünk. A jellemző kísérleti körülmények között 1 µg fehérjemintát kevertünk 4× SDS tartalmú felvivő pufferbe 30 µL végtérfogatban, amelyet 10 percig 95 °C hőmérsékleten előkezeltünk, majd a gél mintafelvivő zsebébe mértünk. A

futtatást TGS (Tris-glicin-SDS) pufferben, kezdetben 60 V, majd a fehérjék szeparáló gélbe jutásától 120 V feszültséggel végeztük el. A mintákat másfél órán át futtattuk a Mini-PROTEAN Tetra Handcast Systems és PowerPac Universal Power Supply (BioRAD) használatával. Futás után a gélt fixáló oldatba 1 órán át inkubáltuk, majd Blue Silver festékekkel egy éjszakán át festettük. A fehérjékhez nem kötődött festéket 1%-os ecetsavas mosással távolítottuk el a poliakrilamid gélből.

SDS-szerparáló gél összetétele (5 mL/gél): 1,9 mL H<sub>2</sub>O, 1,7 mL 30% akrilamid-biszakrilamid (29:1), 1,3 mL 1,5 M Tris-HCl (pH=8,80), 0,05 mL 10% SDS, 0,05 mL 10% ammónium-perszulfát, 3 µL TEMED.

SDS-gyűjtő gél összetétele (3 mL/gél): 2,1 mL H<sub>2</sub>O, 0,5 mL 30% akrilamid-biszakrilamid (29:1), 0,38 mL 1,5 M Tris-HCl (pH=6,80), 0,03 mL 10% SDS, 0,03 mL 10% ammónium-perszulfát, 3 µL TEMED.

4× SDS felvivő puffer összetétele: 100 mM Tris-HCl (pH=6,80), 200 mM DTT, 4% SDS, 0,2% brómfenolkék, 20% glicerin.

TGS puffer összetétele: 25 mM Tris-Base, 192 mM glicin, 0,1% SDS (pH=8,30).

Fixáló oldat összetétele: 30% etanol, 10% ecetsav.

Blue Silver festék összetétele: 680 mL/L víz, 117,64 mL/L 85% foszforsav, 100 g/L ammónium-szulfát, 1,2 g/L Coomassie Blue R-250, 200 mL/L metanol.

### 3.5.3 Western-blot hibridizáció

A fehérjék *in vitro* immundetektálásához SDS-PAGE-t követően a vizsgált minták elválasztott fehérjéit elektromos tér alkalmazásával nitrocellulóz membránra (Amersham<sup>TM</sup> Hybond<sup>TM</sup>-ECL) jutattuk át TransBlot<sup>®</sup> SD Semi-Dry Transfer Cell (BioRAD) készülék használatával 25 mV feszültséget alkalmazva 45 percig. A fehérjeoldatok áramoltatásához megfelelő közeget a Transzfer puffer biztosította. A nitrocellulóz membránt ezután 1 órán keresztül blokkoló pufferben (1 m/V% tejpor PBS-T puffer) rázatva inkubáltuk 70 rpm sebességgel körkörös síkrázógéppel (IKA KS 501 körkörös síkrázógép), a membrán szabad kötőhelyeinek telítése érdekében. A StrepMAB-Classic-HRP antitestet (IBA) 1:100.000-es hígításban, PBS-T pufferben alkalmaztuk, amely a Strep-tag II peptidet tartalmazó SqrF fehérjék jelenlétét képes kimutatni. A membránt, annak méretétől függő mennyiségű

ellenanyagot tartalmazó pufferben szobahőmérsékleten, 1 órán át rázatva inkubáltuk 70 rpm sebességgel körkörös síkrázógéppel (IKA KS 501 körkörös síkrázógép). Ezt követően PBS-T, majd PBS pufferrel mostuk 1-1 percig. A torna-peroxidázzal fuzionáltatott antitestek kimutatását biztosító fényreakcióhoz 3 mL térfogatú, hidrogén-peroxid és luminol 1:1 arányú keverékét használtuk a SuperSignal West Pico Rabbit IgG Detection Kit-et alkalmazva (Pierce). Az eleggyel 1 percig inkubáltuk a membránt, majd a kemilumineszcens jelet CCD kamerával detektáltuk (VersaDoc 4000MP (BioRAD)).

Transzfer puffer összetétele: 48 mM Tris, 39 mM glicin, 20% metanol, 1,3 mM SDS pH=9,20.

PBS puffer összetétele: 115 mM NaCl, 4 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 16 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH=7,50.

PBS-T puffer: 115 mM NaCl, 4 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 16 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,1% Tween 20 pH=7,50.

Blokkoló puffer: 115 mM NaCl, 4 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 16 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,1% Tween 20, 1% zsírszegény tejpor, pH=7,50.

### 3.5.4 Fehérje abszorpciós spektrumának meghatározása

Az affinitás kromatográfiával tisztított vad típusú és mutáns SqrF fehérje minták abszorpciós spektrumát Nicolet Evolution 300 spektrofotométer segítségével határoztuk meg. A mérésekhez 1 cm fényút hosszúságú kvarcküvetét használtunk. Az abszorpciós spektrumokat 250-850 nm hullámhossz tartományban mértük.

### 3.5.5 A tisztított enzimek szulfid függő kinon redukáló aktivitásának mérése

A *T. roseopersicina* vad típusú és mutáns SqrF minták enzimaktivitását az elektron akceptor kinon molekulák redox állapotától függő abszorpciója változásának mérésével határoztuk meg ismét Nicolet Evolution 300 spektrofotométer (BioRad) alkalmazásával. A minták fényelnyelését szintén 1 cm fényúttal rendelkező kvarcküvetékben mértük. A reakcióelegy Tris-HCl (pH=8,00) puffert, emellett tisztított enzimet, szulfidot, mint elektronodonort és elektronakceptorként DQ-t vagy dUQ-t tartalmazott 1 mL végtérfogatban. Az összetevőket kísérletenként eltérő koncentrációban alkalmaztuk. Az enzimek összehasonlítására használt mérési körülmény (1 mL végtérfogat): 50 mM Tris-HCl (pH=8,00), 200  $\mu\text{M}$  szulfid, 50  $\mu\text{M}$  DQ vagy dUQ és 3,3  $\mu\text{g}$  (ha DQ a szubsztrát) vagy 1  $\mu\text{g}$  (ha dUQ a szubsztrát) enzim, 25 °C hőmérsékleten. Az anaerob körülmény kialakítása érdekében a



gázbiztosan lezárt küvetákban a légteret nitrogén gázzal fűvattuk át 5 percen keresztül. Az enzimek reakciókat az adott kísérletnek megfelelő koncentrációjú nátrium-szulfid ( $\text{Na}_2\text{S}$ ) oldat hozzáadásával indítottuk el, melyet a mérések előtt anaerob körülmények között készítettünk el BACTRON300 anaerob munkahely és inkubátorban (ShelLab). A fényelnyelés-változást DQ esetén 275 nm-en (extinkciós koefficiens:  $16 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  [Degli Esposti és mtsai. 1982]), dUQ esetén 278 nm-en (extinkciós koefficiens:  $12,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  [Kröger 1978]) mértük, az oxidált kinon molekulák maximális fényelnyelést mutató hullámhosszán. A dUQ-t használt vizsgálatoknál detergensre is szükség volt, ez a Tween 20 volt. A dUQ elektronakceptort alkalmazó mérések során szükség volt egy olyan, úgynevezett kontrol minta abszorbanciájának mérésére, amely szulfidot és dUQ-t tartalmazott a kísérletben adott koncentrációnak megfelelő mennyiségben, azonban enzimet egyáltalán nem adtunk hozzá. Ez azért elengedhetetlen, mert a szulfid a dUQ jelenlétében képes redukálódni enzim nélküli körülmények között is, ez az abiotikus kinon redukció. A kísérletek során a minták mért aktivitás értékeiből kivontuk a kontrol minta aktivitás értékét.

### **3.5.6 Vad típusú és tisztított SqrF enzimvariánsok kinetikai paramétereinek meghatározása**

A 3.5.5 fejezetben részletezett az enzimek összehasonlítására alkalmazott mérési körülmények között kerültek meghatározásra a kinetikai paraméterek a szulfid-függő kinon redukáló aktivitás mérésekkel különböző koncentrációban alkalmazva a DQ-t (50-150  $\mu\text{M}$ ) vagy dUQ-t (5-100  $\mu\text{M}$ ). A különböző enzimaktivitás értékekből kapott görbére a MatLab program Michaelis-Menten egyenlet segítségével illesztett nem lineáris regressziós analízist alkalmaztuk (Dorf és Bishop 2011). A szulfid kinon oxidoreduktáz aktivitásának egysége 1  $\mu\text{mol/perc}$  kinon redukció.

### **3.5.7 Vad típusú és mutációt hordozó SqrF enzimek aktivációs energiájának meghatározása**

A vizsgált enzimreakciók aktivációs energiáját az enzimaktivitásuk fiziológiás tartományú hőmérséklet-függés mérése útján határoztuk meg. Az enzim-katalizálta reakciók hőmérsékletfüggését a 3.5.5. fejezetben leírt módszerrel, a reakcióhőmérséklet kísérletenkénti változtatásával mértük meg (10-70 °C hőmérsékleti tartományban). A különböző SqrF enzimek specifikus aktivitások logaritmusát a hőmérséklet reciprokának függvényében ábrázoltuk, melyet Kelvinben adtunk meg, majd a MatLab program segítségével a kapott pontokra egyenest

illesztettünk. Az egyenes meredekségéből az Arrhenius-egyenlet segítségével:  $k=Ae^{-E_a/RT}$  számoltuk ki az aktivációs energiát.

### **3.5.8 A tisztított vad típusú és mutáns SqrF enzimvariánsok redox állapotának megváltoztatása**

A 10  $\mu$ M koncentrációjú SqrF fehérje mintákhoz frissen készítettük el és adtuk hozzá az általánosan használt erős redukálószer, az 1 mM nátrium-ditionitot vagy a természetes szubsztrátját, a szulfidot. Az oxidált állapot eléréséhez 100  $\mu$ M koncentrációjú DQ-t, mint elektronakceptort adtunk a reakcióelegyhez.

## **3.6 Bioinformatikai analízis**

### **3.6.1 A *T. roseopersicina* SqrF homológia modellje**

A *T. roseopersicina* SqrF fehérje szerkezetének modelljét homológia modellezés módszerrel készítette el Dr. Paragi Gábor, a Pécsi Tudományegyetem Természettudományi Kar Fizikai Intézet Elméleti Fizika Tanszék tudományos főmunkatársa, a Schrödinger programcsomag Prime moduljának (Jacobson és mtsai. 2004, 2002) alkalmazásával. A felhasznált templát szerkezeteket a BLASTP homológiakereső program (Altschul és mtsai. 1990; Madden és mtsai. 1996) segítségével választotta ki. A *T. roseopersicina* SqrF fehérjével megegyező fehérjecsaládba tartozó *A. ambivalens* és *A. aeolicus* SqrA és SqrE fehérjék röntgenkristallográfiás szerkezete ismert (PDB [Protein Adatbázis] azonosító (ID): 3H8L, 3HYW, 3HYV), így ezek a legalkalmasabbak a homológia modell építésére a szekvencia-illesztés alapján (Brito és mtsai. 2009; Marcia és mtsai. 2010a). A három szerkezethez kapott szekvencia azonosság értékek: 41.4%, 39.8% és 39.5%, melyek megfelelnek a szekvencia illesztés kritériumainak. A kiinduló modell alapja a 3H8L, a hiányzó C-terminális rész szerkezete pedig a 3HYV segítségével készült el. A dUQ pozíciójának a meghatározásához a fehérjében a 3HYW a templát, mivel ezt az enzimet dUQ liganddal együtt sikerült kristályosítani (Marcia és mtsai. 2009). A Prime modul energia alapú homológia építésével egyetlen homológia modellt kapott. A hurkokat hurokmodellezés módszerrel építette meg, ezeknek az úgynevezett változékony régióknak a pontos meghatározása nehezebb. Ennek segítségével becsülhető meg a különböző aminosavak közötti tényleges távolság. A homológia építés során a modell energia minimalizálása megtörtént a modell finomítása céljából a Macromodel modul (Schrödinger Release 2022-2) segítségével, amely az OPLS2005 erőteret és az SPC explicit vízmodell kombinációját alkalmazza a kölcsönhatások pontosabb meghatározásához, ez a homológia modell pontosságát javítja (Bowers és mtsai. 2006; Jorgensen és mtsai. 1996).

### 3.6.2 Protein-ligand kölcsönhatás *in silico* molekuladinamikai analízise

A molekuláris dinamikai számítások kiinduló szerkezete a 3.6.1 fejezetben elkészült *T. roseopersicina* SqrF homológia modell, amelyekkel Dr. Paragi Gábor a ligandokkal (FAD kofaktor, dUQ elektronakceptor) kötött komplex felépítését származtatta. A dUQ molekuláris környezete és a ligandtól 10 Å távolságra lévő terület fehérjeszerkezetét REMD/REST (Replika-csere molekuladinamika) számítással 250 nanomásodperc hosszú időintervallumban vizsgálta (Wang és mtsai. 2011). A hőmérséklettartományt a Schrödinger program Simulation Interactions Diagram modulja automatikusan határozza meg, ahol a legalacsonyabb érték 300 K. A REMD/REST módszer több, párhuzamosan és eltérő hőmérsékleten futó szimulációt jelent. Eközben a különböző hőmérsékleten állandósuló szerkezetek egymás közötti cseréje is megtörténik időről-időre. Ha a fázistér egy olyan energiaminumba kerül, amely a további szimulációk szerkezetét torzítaná, ebben az esetben lehetőség van arra, hogy egy magasabb hőmérsékleten kialakuló konformációval cserélve kiszabaduljon ebből az állapotból. Tehát a magas energiagáttal rendelkező konformációk is feltérképezhetővé válnak a hőmérséklet cseréjével. Az analízis során 2500 modell készült el. A szimulált molekuladinamikai modellekben a szoftver azt vizsgálja, hogy a dUQ melyik aminosavakkal van kapcsolatban és ez milyen kölcsönhatáson keresztül valósul meg. A kijelölt atomok közötti távolságok meghatározása az egyes szimulált szerkezetekben is az alkalmazott programcsomaggal történt.

### 3.6.3 Statisztikai számítások

A kísérleti eredményekhez tartozó statisztikai számításokat Welch-féle kétmintás t-próba alkalmazásával ( $p \leq 0,01^*$ ,  $p \leq 0,001^{**}$ ), az R Studio statisztikai szoftvercsomag segítségével végeztük el. A bemutatott eredményeket átlag±standard hiba (SE) ábráztuk.

## 4. Eredmények

### 4.1 A *T. roseopersicina* SqrF fehérje kinon kötőhelyének azonosítása és szerepe a katalízisben

Kutatócsoportunk célja a *T. roseopersicina* SqrF fehérje vizsgálata, működésének a részletes megismerése volt. Ez a fehérje az eddigi ismeretek alapján az SQR enzimek funkciójában fontos szerepet játszó több szerkezeti elemében és a katalitikus mechanizmusában is eltér más típusú SQR fehérjéktől (1.4.1 és 1.5.1 fejezetben részletesen leírva). A VI. típusú SQR-ek magas szulfid koncentrációjú környezetben élő mikroorganizmusokban is előfordulnak, ezért ezek az enzimek alkalmazhatóak lehetnek a természetben a szulfid detoxifikálásában. Korábban a konzervált ciszteinek mutagenézis alapú vizsgálatával kutatócsoportunk jellemezte ezeknek az aminosavaknak a lehetséges szerepét a két lépéses redox reakció szulfid oxidációs lépésében. Ezek alapján felállítottuk az enzim működési modelljét (1.5.1 fejezet). Azonban a katalízis második lépéséről, a kinon redukció folyamatáról és az abban részt vevő aminosavakról kevés információ áll rendelkezésre. Jelenleg kettő SQR fehérje kristályszerkezete ismert dUQ kötött formában is. Emellett a feltételezhetően a kinon kötésben, redukcióban szerepet játszó aminosavak mutagenézis alapú vizsgálatából és biokémiai jellemzéséből származó információk is rendelkezésünkre állnak. Tehát azonosították néhány SQR esetén a kinon kötésben részt vevő aminosavakat, igazolták a C-terminális régió szerepét a membránkötésben, valamint a FAD-kinon közötti közvetlen elektrontranszfert.

A munkánk során a célunk volt az ismert szerkezetű SQR enzimek kinon kötőhelyéből kiindulva a *T. roseopersicina* SqrF fehérjében azonosítani a kinon kötő csatornát és meghatározni az azt felépítő aminosavak lehetséges szerepét.

#### 4.1.1 A vad típusú *T. roseopersicina* SqrF kinon kötőhelyének analízise

##### 4.1.1.1A *T. roseopersicina* SqrF fehérje kinon kötőhelyének meghatározása

A *T. roseopersicina* SqrF enzim kinon kötőhelyét kialakító aminosavak azonosításához a dUQ kötött állapotban kristályosított bakteriális SQR fehérjék röntgendiffrakcióval meghatározott szerkezeteiből indultunk ki. A dUQ kötött kristályszerkezetek alapján az *A. ferrooxidans* és az *A. aeolicus* SqrA fehérjékben a Val355, Phe357 és a Phe394, illetve az Ile346, Ile348 és a Phe385 aminosavak helyezkednek el a fehérjében megkötött szubsztrát molekula közvetlen környezetében. A kristályszerkezetek és az SQR fehérjék C-terminális doménjeit alkotó aminosavak sorrendjének többszörös szekvencia illesztésen alapuló összehasonlításával megállapítható, hogy a *T. roseopersicina* SqrF elsődleges szerkezetében

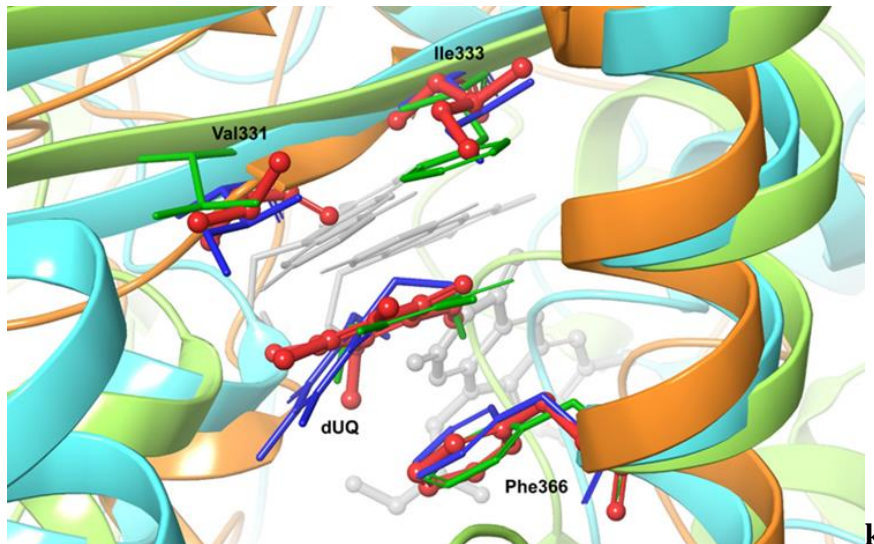
a Val331, az Ile333 és a Phe366 helyezkednek el hasonló pozícióban, mint az SqrA enzimek kinon kötő csatornáját kialakító apoláris aminosavak (**17. ábra**).

		Val355	Phe357	Phe394
<i>A. ferrooxidans</i>	SqrA	NAV <b>C</b> FADMGD		K-VA <b>F</b> EKYFI
<i>R. capsulatus</i>	SqrA	NAV <b>C</b> LADFGD		K-EG <b>F</b> ERYFM
<i>A. aeolicus</i>	SqrA	SA <b>I</b> C <b>I</b> ADFGE		K-TA <b>F</b> EKYFL
		Ile346	Ile348	Phe385
<i>H. sapiens</i>	SqrB	YT <b>S</b> C <b>P</b> LVTGY		KAD <b>L</b> M <b>P</b> FLYW
<i>Synechocystis</i> sp.	SqrB	YT <b>C</b> C <b>P</b> LVTGY		KRY <b>V</b> L <b>P</b> WLYW
<i>S. pombe</i>	SqrB	YT <b>S</b> C <b>P</b> LLTGY		KKD <b>F</b> F <b>P</b> FVYW
<i>S. solfataricus</i>	SqrC	DV <b>L</b> C <b>Y</b> IATGT		K-IM <b>Y</b> NKMYW
<i>C. tepidum</i>	SqrC	HS <b>T</b> C <b>F</b> IVYSK		K-LA <b>F</b> EPLYW
<i>C. maquilingensis</i>	SqrC	R <b>T</b> H <b>C</b> P <b>F</b> DMGY		K-L <b>T</b> F <b>A</b> ASYW
<i>A. vinosum</i>	SqrD	GA <b>A</b> C <b>V</b> ASTGM		TYPE <b>Y</b> GRDMD
<i>S. denitrificans</i>	SqrD	GA <b>A</b> C <b>V</b> ASAGK		KYP <b>G</b> T <b>G</b> RDTD
<i>C. tepidum</i>	SqrD	GA <b>A</b> C <b>I</b> VSAGF		KYPE <b>W</b> GRDMT
<i>A. ambivalens</i>	SqrE	T <b>I</b> M <b>C</b> VADNPY		KKE <b>L</b> F <b>T</b> KYYM
<i>S. solfataricus</i>	SqrE	T <b>I</b> I <b>C</b> VADNPF		KKE <b>L</b> F <b>H</b> KYFI
<i>C. tepidum</i>	SqrE	EV <b>I</b> C <b>Y</b> GDMGD		VAF <b>K</b> T <b>S</b> YFAM
<i>A. aeolicus</i>	SqrF	N <b>I</b> L <b>C</b> LMDMGW		K-KA <b>W</b> GVYYK
<i>C. tepidum</i>	SqrF	N <b>V</b> L <b>C</b> VMDTGD		K-KA <b>W</b> GYYK
<i>A. vinosum</i>	SqrF	EL <b>L</b> C <b>I</b> VDTND		K-R <b>F</b> F <b>E</b> WLYL
<b><i>T. roseopersicina</i></b>	<b>SqrF</b>	EL <b>V</b> C <b>I</b> VDAND		K-L <b>G</b> F <b>E</b> WYYL
		Val331	Ile333	Phe366

**17. ábra:** Az SQR-típusú fehérjék C-terminális doménben elhelyezkedő két szakaszának fehérjeszekvencia összehasonlítása többszörös illesztéssel. Az enzimek kinon kötőhelyét kialakító aminosavak vastagított betűvel, a konzervált cisztein piros színnel vannak kiemelve

A *T. roseopersicina* SqrF fehérjében az aminosavak lehetséges térbeli elhelyezkedését homológia modellezéssel határoztuk meg. Ez alapján a Val331, Ile333 és a Phe366 aminosavak szintén egy csatorna szerkezetet formálnak az SqrF fehérjében. Ez nagyon nagy hasonlóságot mutat más típusú SQR fehérjék homológ apoláris aminosavai által kialakított kinon kötő csatornához. A *T. roseopersicina* SqrF szerkezeti modelljében a kinon redox fejcsoportját a Val331 apoláris oldalláncú aminosav és Phe366 aromás aminosav benzolgyűrűje fogja közre (**18. ábra**). Ez hasonlít a dUQ molekulák elhelyezkedéséhez az *A. aeolicus* SqrA enzimben, ahol a dUQ benzokinon feji régiója az Ile346 és Phe385 (*A. aeolicus* szerinti számozás)

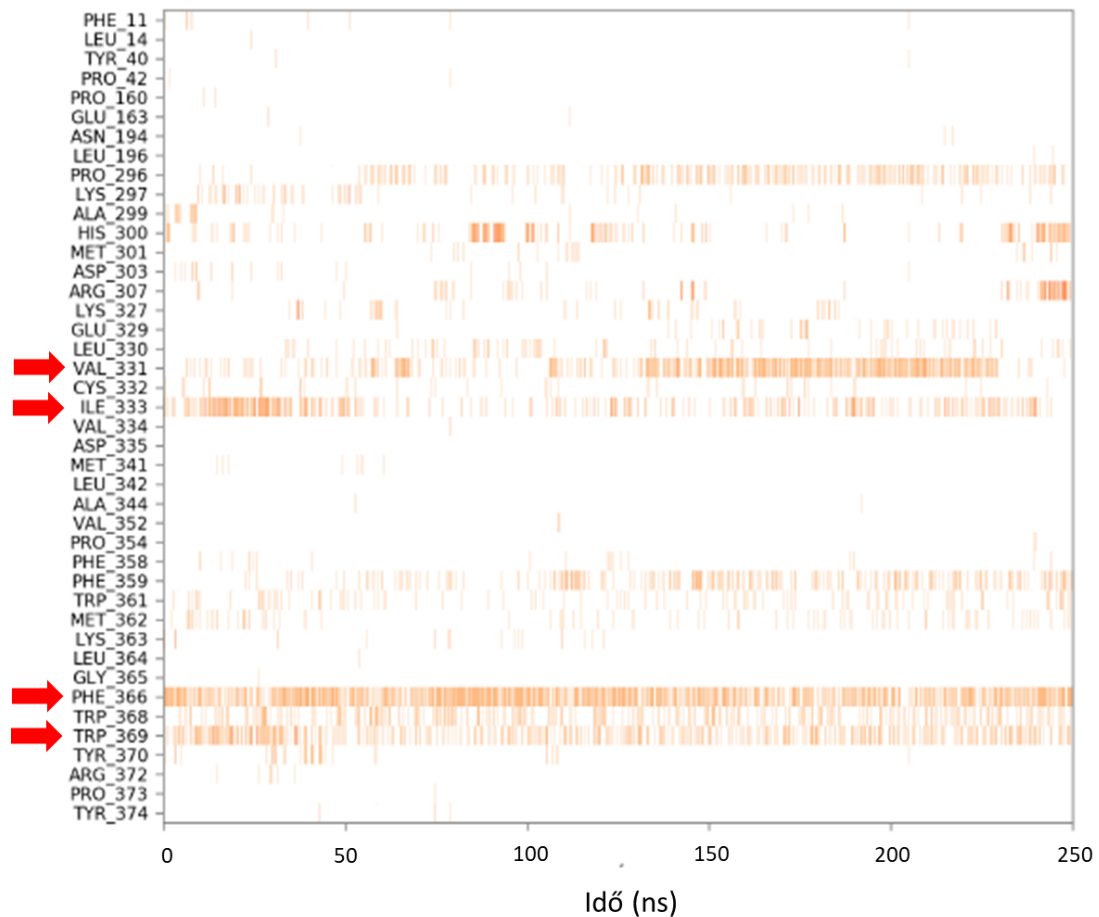
aminosavak között helyezkedik el (Marcia és mtsai. 2009). Ezzel ellentétben az *A. ferrooxidans* SqrA fehérjében a dUQ fejcsoportja két aromás aminosav, a Phe357 és Phe394 (*A. ferrooxidans* szerinti számozás) között foglal helyet. Ezek a fenilalaninok a *T. roseopersicina* SqrF Ile333 és Phe366 aminosavakkal homológok (Cherney és mtsai. 2010).



**18. ábra:** Az *A. ferrooxidans*, az *A. aeolicus* és a *T. roseopersicina* SQR fehérjék kinon kötőhely szerkezetének összehasonlítása. A *T. roseopersicina* SqrF Val331, Ile333 és Phe366 aminosavaknak megfelelő aminosavak, valamint a dUQ ligand láthatóak golyó- és pálcá modellel. Világoszöld jelöli az *A. ferrooxidans* SqrA röntgenkristallográfiával meghatározott fehérjeszerkezetét (valin, fenilalanin, fenilalanin), világoskék az *A. aeolicus* SqrA röntgenkristallográfiás képét (leucin, leucin, triptofán) és narancssárga jelöli a *T. roseopersicina* SqrF homológia modelljét (valin, izoleucin, fenilalanin). A FAD kofaktor világos szürke pálcá- vagy golyó- (*T. roseopersicina* SqrF fehérjében), és pálcá modellel (*A. ferrooxidans* és *A. aeolicus* SqrA fehérjében) került ábrázolásra

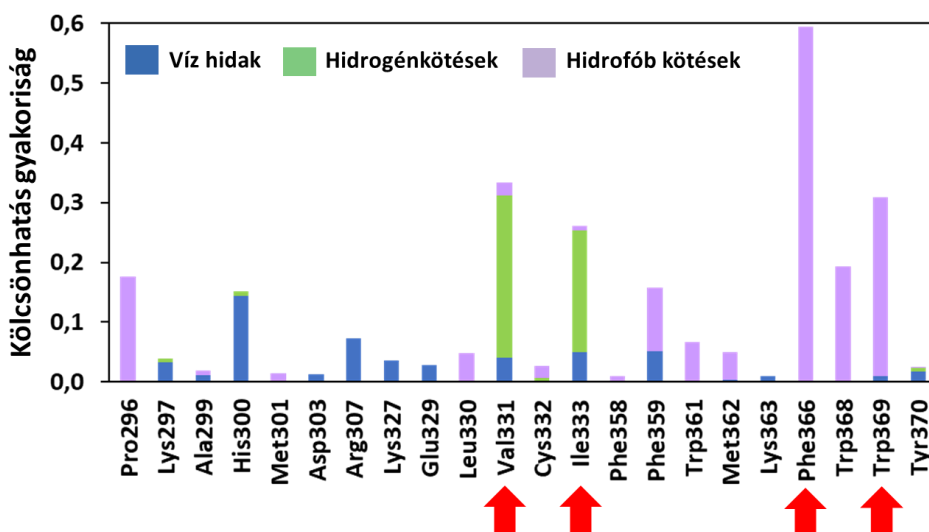
#### 4.1.1.2A *T. roseopersicina* SqrF és a dUQ szubsztrát közötti kölcsönhatás *in silico* vizsgálata

A protein-ligand kölcsönhatás modellezése segíti az SqrF fehérje kinon kötésében szerepet játszó aminosavak pontosabb megismerését és funkcionális szerepük meghatározását. A REST módszer (3.6.2 fejezet) segítségével modelleztük a szubsztrátot kötő enzim szerkezetét, a komplex összes lehetséges variánsát reprezentáló modell szerkezetek létrehozásával. Ehhez a fehérjét dUQ kötött állapotban különböző hőmérsékleteken modelleztük, amelyből a program a legjobb szerkezetet választotta ki a szerkezeti szimuláció adott időpontjában. A 2500 szimulált molekulaszervezetben kiértékeljük, hogy milyen aminosavakkal lépett kölcsönhatásba a dUQ, milyen kötés alakult ki közöttük és az aminosav-dUQ, valamint a FAD-dUQ távolságadatokat is kiszámítottuk.



**19. ábra:** A REST módszerrel szimulált *T. roseopersicina* SqrF-dUQ szerkezetekben azonosított aminosav-ligand kölcsönhatások. Az idővonal ábrázolja a szimulációban meghatározott egyes szerkezetekben az aminosav-ligand kölcsönhatásokat. A piros nyilak jelölik az SqrF fehérje azon aminosavait, amelyek kölcsönhatása a kinon molekulával a modellezett szerkezetek nagy részében kimutatható

A létrejövő kötések vizsgálva láthatjuk, hogy a modellezett fehérje-ligand szerkezetekben, ahol a dUQ és a Val331 között kölcsönhatás jött létre, az Ile333 a dUQ-val nem lépett kapcsolatba és fordítva (**19. ábra**). A 2500 szimulált szerkezetből a legtöbb modellben a Phe366 aminosav és a dUQ redox fejcsoportja között kötés alakult ki (**19. ábra**). A Trp369 az elektronakceptorral kapcsolatba lépett a modellek egy jelentősebb részében. Ez az aminosav a dUQ flexibilisebb decil oldalláncához kapcsolódott a modellezett komplexekben a homológia modell alapján.

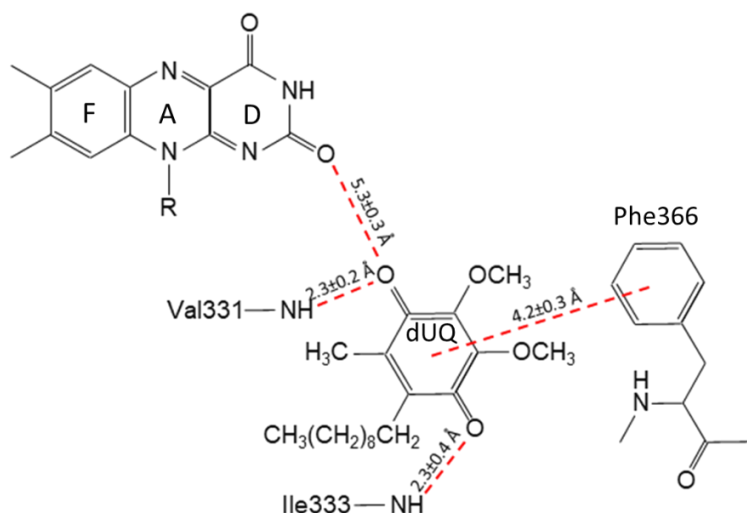


**20. ábra:** A kémiai kölcsönhatások gyakorisága és típusa a vad típusú *T. roseopersicina* SqrF fehérje és a dUQ ligand között a modellezett SqrF-szubsztrát molekula komplexekben

A **20. ábra** a *T. roseopersicina* SqrF és a dUQ között levő kémiai kölcsönhatások típusait összegzi a szimulált komplexekben. A hidrofób Val331 és Ile333 aminosavak a legtöbb esetben hidrogénkötéssel kapcsolódtak a dUQ redox fejcsoportjához azokban a komplexekben, amelyekben kölcsönhatás volt közöttük. Amikor az aromás Phe366, valamint a Trp369 kapcsolatba léptek a dUQ-val, akkor leggyakrabban hidrofób (aromás-aromás) kötést alakítottak ki.

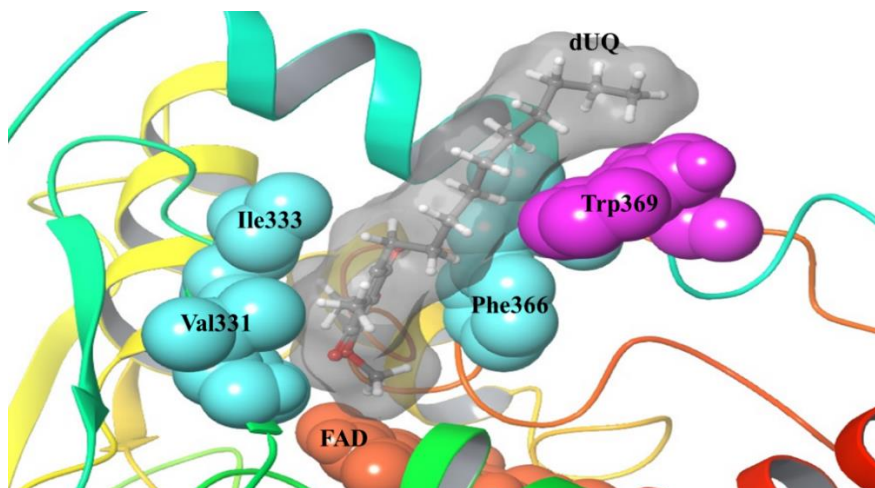
A fehérjébe kötődő dUQ térbeli helyzetének pontosabb felderítése, valamint a FAD kofaktor és a kinon szubsztrát között történő elektronátadás módjának megismerése céljából távolságot számoltunk. Meghatároztuk a dUQ benzokinon gyűrű egyes csoportjainak, és a dUQ-val a modellezett szerkezetek többségében kölcsönhatásban levő aminosavak megfelelő csoportjainak a távolságát. Ehhez minden olyan fehérje modellben páronként megmértük a meghatározott dUQ és aminosav atomok közti távolságokat, amelyekben kölcsönhatás volt kimutatható az adott aminosavval. A megmért atomi távolságot átlagoltuk. A szimuláció alapján számolt távolságot szerint a legrövidebb távolságú fehérje-ligand kölcsönhatások: a Val331 peptid kötésbeli amidcsoportjának hidrogénje és a dUQ O4 atomja közötti távolság  $2,3 \pm 0,2$  Å volt. Az Ile333 peptidlánc amidjának hidrogénje és a dUQ O1 atomja között  $2,3 \pm 0,4$  Å volt a távolság (**21. ábra**). A Phe366 benzolgyűrűjének és a dUQ benzokinon gyűrűjének középpontjai közötti távolság  $4,2 \pm 0,3$  Å volt (**21. ábra**). Továbbá a FAD izoalloxazin gyűrűjének O2 atomja és a ligand gyűrűjének O4 atomja közti távolság  $5,3 \pm 0,3$  Å volt, vagyis az SqrF enzim kofaktora és szubsztrátja elegendően közel kerülnek egymáshoz, hogy az elektronátadás közvetlenül végbe tudjon menni közöttük (**21. ábra**).





**21. ábra:** A *T. roseopersicina* SqrF kinon kötőhely aminosavak és a FAD kofaktor, valamint a dUQ ligand között mért távolságadatok

A **22. ábra** mutatja a szerkezeti és szimulációs adatok alapján a kinon kötőhelyet kialakító és a dUQ liganddal kapcsolatot létrehozó aminosavak elhelyezkedését. Az apoláris csatornában egyik oldalon a Val331 és Ile333, a másik oldalán a Phe366 fogja közre a dUQ benzokinon feji csoportját. A Phe366 csoport közelében, ugyanabban a C-terminális  $\alpha$ -hélixben elhelyezkedő Trp369 pedig a dUQ decil oldallánc régiójával lép kölcsönhatásba.

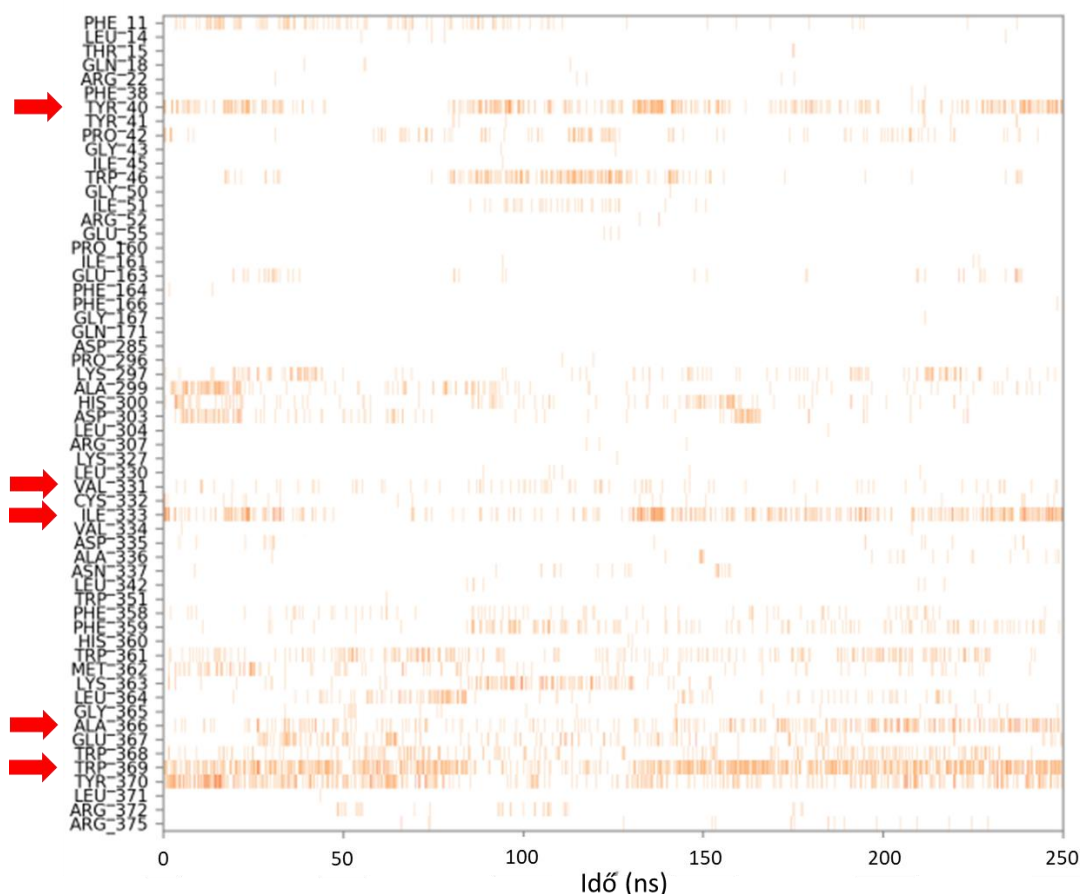


**22. ábra:** A *T. roseopersicina* SqrF-dUQ komplex feltételezett szerkezeti modellje. A kinon kötőhelyet felépítő apoláris aminosavak, Val331, Ile333, Phe366 ciánkékkel vannak jelölve. A kötött állapotú dUQ golyó és pálca modellel került ábrázolásra, a molekulafelszíne szürkével jelölt. A Trp369 aminosav magenta színnel jelölt és a ligand decil oldalláncával alakít ki kapcsolatot. A FAD kofaktort narancssárga szín ábrázolja

#### 4.1.2 Az SqrF F366A enzimvariáns szerkezeti analízise *in silico* molekuladinamikai módszerekkel

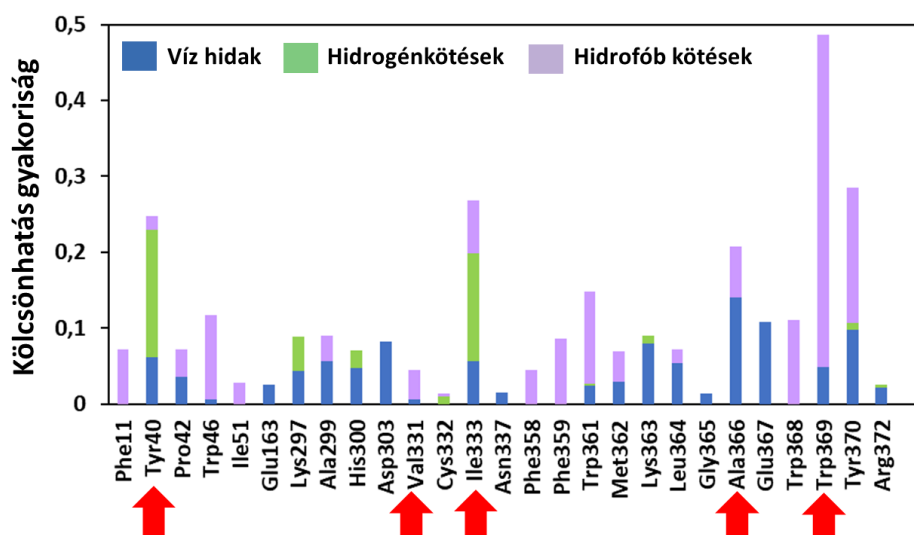
A kinon kötőhelyet kialakító aminosavak szerepének igazolására az egyik lehetőség olyan enzimváltozatok funkcionális vizsgálata, amelyekben ezeket az aminosavakat pontmutációk segítségével megváltoztatjuk. A mutáns enzimek elkészítése előtt, egy ilyen, a kinon kötésben részt vevő aminosavat érintő mutáció hatását *in silico* molekuladinamikai módszerekkel vizsgáltuk: egy pontmutáns SqrF fehérje szerkezeti modelljének elkészítésével és a protein-ligand kölcsönhatások elemzésével. Az F366A enzimvariáns *in silico* molekulamodellje a 3.6.2 fejezetben alkalmazott módszerekkel, a vad típusú SqrF enzim homológia modellje alapján készült el. A meglévő vad típusú modellezett szerkezetben a nagyobb térigényű, aromás Phe366 csoport a kisebb, hidrofób alaninra lett cserélve. A két aminosav között a benzolgyűrű jelenléte vagy hiánya a különbség.

A molekuladinamikai analízist a vad típusú SqrF esetén részletesen leírt (3.6.2 fejezet, 4.1.1.2 fejezet) REST módszerrel végeztük el. A 250 ns szimulációs időtartam alatt, 300 – 400 K hőmérséklet tartományban 10 különböző hőmérséklet értéken végzett molekuladinamikai alapú modellezéssel 2500 szimulált dUQ kötő SqrF F366A szerkezetet hoztunk létre. Ez feltehetően teljes mértékben reprezentálja a lehetséges komplex szerkezeteket (**23. ábra**).



**23. ábra:** A REST módszerrel szimulált *T. roseopersicina* SqrF F366A-dUQ szerkezetekben azonosított aminosav-ligand kölcsönhatások. Az idővonal ábrázolja a szimulációban meghatározott egyes molekuladinamikai szerkezetekben az aminosav-ligand kölcsönhatásokat. A piros nyilak jelölik az F366A fehérje variáns azon aminosavait, amelyek kölcsönhatása a kinon molekulával a modellezett szerkezetek nagy részében kimutatható

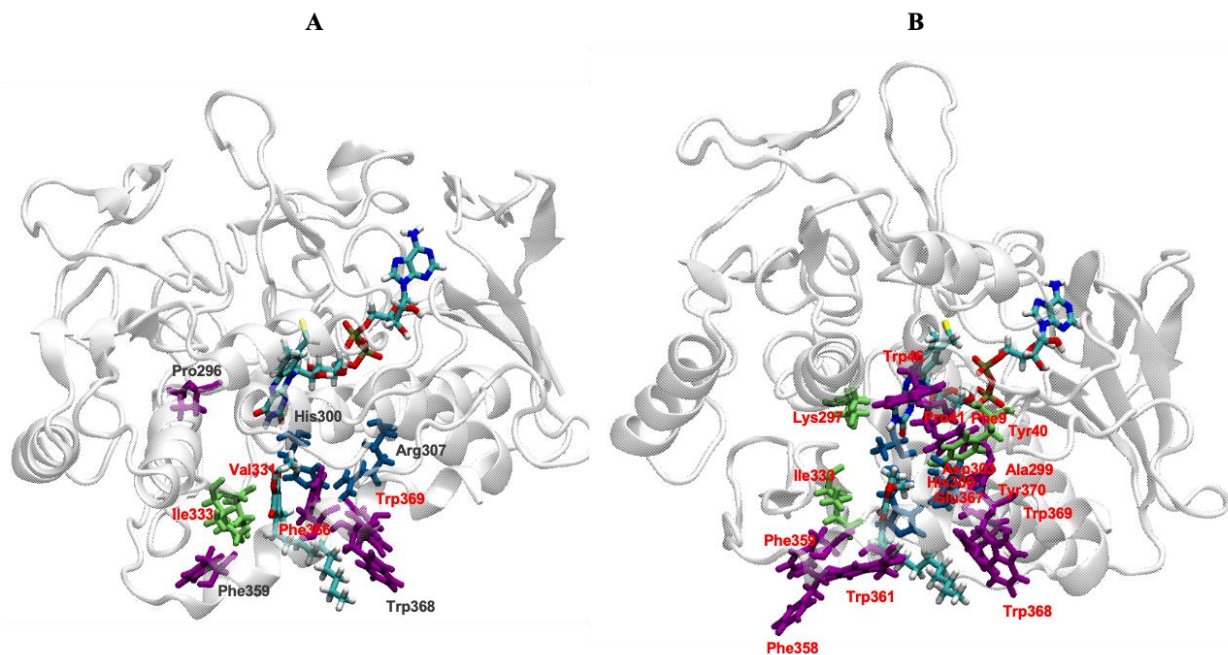
A vad típusú SqrF analízise során kapott eredményekkel összehasonlítva a Val331 aminosavhoz kisebb gyakorisággal kötődött a dUQ. Azonban megnőtt azoknak a modell fehérje-ligand szerkezeteknek az aránya, amelyekben az Ile333-mal került kölcsönhatásba a kinon szubsztrát. (**23. ábra**, **19. ábra**). A vad típusú SqrF fehérjében a Phe366-tal nagy gyakorisággal alakított ki kapcsolatot a dUQ az egész szimuláció alatt (**19. ábra**), alaninra cserélésével azonban jelentősen csökkent a kötés gyakoriság (**23. ábra**). A Trp369 aromás aminosavval nagyobb arányban lépett kölcsönhatásba a szubsztrát (**23. ábra**), mint a vad típusban (**19. ábra**). Valamint az SqrF F366A mutáns esetében jelentősen nagyobb volt azoknak a modelleknek a száma, amelyekben kölcsönhatás volt a dUQ és a Tyr40 között (**23. ábra**). A vad típusú SqrF szimulációjában ezzel az aminosavval a szubsztrát csak kevés modellben került kapcsolatba (**19. ábra**).



24. ábra: Másodlagos kölcsönhatások a *T. roseopersicina* SqrF F366A variáns és a dUQ ligand között

A kialakuló kémiai kölcsönhatások típusainak vizsgálatával megállapítható, hogy az SqrF F366A cserével megváltoztak a vad típusú SqrF enzim aminosavai és a dUQ között lévő kapcsolatok (20. ábra, 24. ábra). A Tyr40 aminosavval főként hidrogénkötésen keresztül lépett kapcsolatba a szubsztrát, míg a Val331 csoporttal leginkább hidrofób volt a kevés kialakuló kölcsönhatás (10% alatti). Az Ile333 aminosavval a kölcsönhatások leggyakrabban hidrogénkötésen keresztül valósultak meg, de előfordult hidrofób és vizes kötés is a szimuláció során (24. ábra). Az SqrF F366A variáns különböző lehetséges modelljeinek kb. 20%-ában az Ala366 a dUQ-val, elsősorban víz híd kötésen keresztül lépett kapcsolatba, kisebb részben hidrofób volt a kapcsolat közöttük (24. ábra). A vad típusú SqrF-ben a Phe366-dUQ (nagy részt) hidrofób kapcsolat közel 60% volt a szimulált modellekben (20. ábra). A Trp369 aminosavval a dUQ az SqrF F366A modellek kb. 50%-ban, túlnyomórészt hidrofób kapcsolatot hozott létre (24. ábra), ami hasonló volt a vad típussal végrehajtott szimulációhoz (20. ábra).

A vad típusú SqrF és SqrF F366A fehérjék homológia modellje alapján (25. ábra) a fenilalanin alaninra cserélésével a dUQ a fehérje több aminosavával tudott kapcsolatba lépni, köztük sok olyannal, amelyek nagyobb távolságra helyezkednek el az enzim kinon kötő csatornájától. A fenilalanin alaninra cserélésével a csatorna mérete nagyobb lett a benzilgyűrű hiánya következtében. Ennek eredményeként megnőtt a csatorna flexibilitása, és a dUQ előtt utak nyíltak meg a fehérje olyan régióiba is, amelyekbe a vad típusú fehérjében nem tud eljutni. Ennek következtében a dUQ a pontmutáns fehérje aktív centrumának nagyobb környezetében, több aminosavval képes kapcsolatot kialakítani.



25. ábra: A *T. roseopersicina* SqrF vad típusú (A) és SqrF F366A (B) mutáns harmadlagos szerkezeteinek homológia modellje a dUQ-val kölcsönhatást kialakítani képes aminosavak ábrázolásával

#### 4.1.3 A *T. roseopersicina* SqrF kinon kötőhelyét alkotó aminosavak funkciója

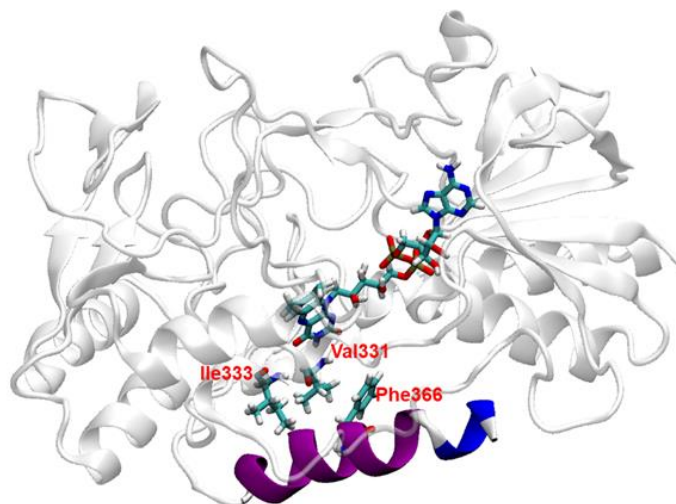
Az *in silico* vizsgálatok felfedték a kinon kötőhelyet kialakító aminosavakat, amelyek a Val331, Ile333 és Phe366 vad típusú *T. roseopersicina* SqrF esetében. Az SqrF F366A bioinformatikai modellezése és *in silico* analízise alapján a fenilalanin alaninra cserélése, ami kisebb helyet foglal el a szerkezetben, hatással volt a kinon kötőhelyre. Ezért, a célunk a kinon kötőhelyet kialakító aminosavak kinon redukcióban betöltött szerepének felderítése volt kísérletes módszerekkel és mutánsok létrehozásával.

##### 4.1.3.1 Kinon kötőhely és C-terminális $\alpha$ -hélix mutáns *T. roseopersicina* SqrF változatokat termelő *T. roseopersicina* törzsek létrehozása

*In silico* analízisek alapján a Val331, Ile333 és Phe366 apoláris aminosavak és a Phe366 aminosavat is tartalmazó C-terminális  $\alpha$ -hélix szerepet játszanak a *T. roseopersicina* SqrF kinon kötő csatorna szerkezeti elemének a kialakításában. Célunk az azonosított aminosavak a kinon kötőhely kialakításában betöltött szerepének kísérletes módszerekkel való igazolása volt. További célunk volt a kinon redukció katalízisének folyamatában betöltött funkciójuk meghatározása. Emellett a *T. roseopersicina* SqrF C-terminális régió egyetlen  $\alpha$ -hélixének a membránkötésben betöltött szerepének a meghatározása is célunk volt. Ehhez az aminosavakban pont-, -dupla és triplamutáns, valamint egy C-terminális  $\alpha$ -hélix deléció mutáns SqrF fehérjét termelő *T. roseopersicina* törzseket hoztunk létre. Az SqrF fehérje korábbi

vizsgálatai során elkészített rekombináns és cisztein mutáns enzimeket termelő törzseknél alkalmazott irányított helyspecifikus mutagenézis módszerrel, a pBSQNNNS vektor (10.2 melléklet) felhasználásával hoztuk létre a törzseket (3.3.9 fejezet) (Duzs és mtsai. 2018, 2021). A C-terminális  $\alpha$ -hélix deléciós mutánst (CTD) a fehérje utolsó  $\alpha$ -hélixének eltávolításával (**26. ábra**) hoztuk létre. Ehhez helyspecifikus mutagenézissel három TGA nukleotidot tartalmazó stop kodont helyeztünk az  $\alpha$ -hélix első, a 356. treonin aminosavat kódoló nukleotidok elé az *sqrF* génbe.

A pontmutáns *sqrF* géneket tartalmazó vektorokat konjugációs eljárással *T. roseopersicina* sejtekbe juttattuk, és stabilan fenntartható transzformáns sejtvonalat izoláltunk. Az azonosított rekombináns *T. roseopersicina* sejtvonalak SqrF fehérje termelőképességét a fehérje N-terminálisához fuzionáltatott Strep II affinitás peptidre specifikus antitesttel igazoltuk Western-blot segítségével.



**26. ábra:** A *T. roseopersicina* SqrF fehérje kinon kötő csatornáját kialakító aminosavak és a C-terminális  $\alpha$ -hélix elhelyezkedése a fehérje harmadlagos szerkezetében. Az SqrF modell harmadlagos szerkezetét szalagmodell ábrázolja. A C-terminális  $\alpha$ -hélix lilával színezték. Kék: laza  $\alpha$ -hélix. Fehér: SqrF fehérje harmadlagos szerkezete. Golyó-pálcika modellel pedig a FAD kofaktor és az aktív centrum aminosavai vannak kiemelve

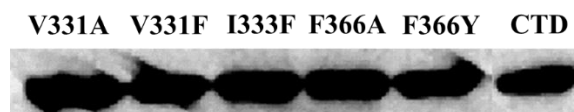
A Val331, Ile333 és Phe366 aminosavakat apoláris alaninra (V331A, I333A, F366A) és aromás aminosavakra (V331F, I333F, F366Y) cseréltük. Ezeken felül készültek dupla alanin mutánsok (V331AI333A, V331AF366A, I333AF366A) és egy hármas alanin mutáns (V331AI333AF366A) fehérjeváltozat is. Az alanin a legegyszerűbb oldalláncú aminosav, aminek a fehérje adott pontjára történő beépítésével a lánckonformáció nem változik meg és nem okoz elektrosztatikus és szterikus változást. Az izoleucin fenilalaninra cserélésének oka az volt, hogy az *A. ferrooxidans* SqrA fehérjében két aromás aminosav fogja közre a kinon gyűrűt, amelyekből az egyik az Ile333 a *T. roseopersicina* SqrF esetében. Érdekes lehet a másik, a



Val331 aromás fenilalaninra cserélése is. A fenilalanin esetén egy másik, polárisabb aromás aminosav, a tirozin hatással lehet az enzim tulajdonságaira, működésére, mivel csak egyetlen -OH csoporttal tér el az előbbitől.

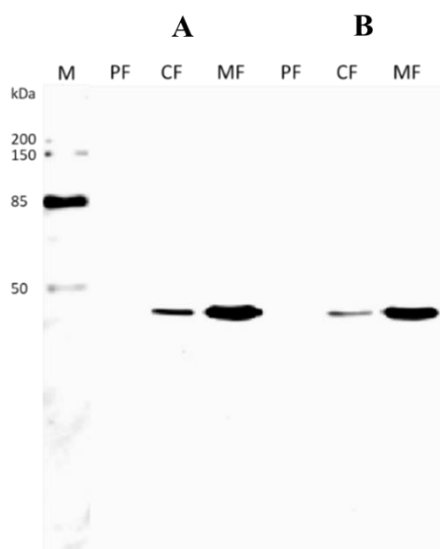
#### 4.1.3.2 Kinon kötőhely és C-terminális $\alpha$ -hélix mutáns *T. roseopersicina* SqrF variánsok termeltetése és tisztítása

A 3.1.2 fejezetben részletesen leírt módszer szerint növesztettük fel és tartottuk fent a mutáns *T. roseopersicina* SqrF enzimváltozatokat expresszázó törzseket. Az egyes törzsekből több sejtvonalat tartottunk fenn párhuzamosan. A folyadékkultúrában többszörös átoltást követően is stabilan növekedni képes sejtvonalak sejt kultúráiból mintát vettünk. Ezt követően ellenőriztük, valamint összehasonlítottuk különböző sejtvonalak rekombináns SqrF fehérje termelő képességét denaturáló gélelektroforézissel kapcsolt Western blot hibridizációs módszerrel. A legjobb rekombináns SqrF termelő képességű sejtvonalak sejt kultúráiból vett, teljes sejteket tartalmazó mintákat forraltuk, majd SDS-PAGE-t követően Strep II antitesttel mutattuk ki az SqrF fehérje jelenlétét (**27. ábra**). Az egyes sejtvonalak fehérjetermelő képessége eltér (kvantitatív adatok nincsenek bemutatva), de minden esetben elegendő rekombináns fehérje képződött.



**27. ábra:** A *T. roseopersicina* SqrF kinon kötőhely és C-terminális  $\alpha$ -hélix deléciós mutáns törzsek fehérjetermelő képességének vizsgálata Western hibridizációval

Ezt követően a legjobban termelő törzseket nagy térfogatú tápoldatba oltottuk le, annak érdekében, hogy nagy mennyiségű biomasszát állítsunk elő az SqrF fehérje expresszázó sejtvonalakból. Megvizsgáltuk a megtermelt pont-, és deléciós mutáns SqrF fehérjék sejten belüli elhelyezkedését. A nagy térfogatú kultúrák sejtjeiből különböző sejtfrakciókat (teljes sejt, periplazma-, citoplazma-, membránfrakció) izoláltunk, amelyek Western blot hibridizációs analízisével megállapítható volt, hogy mindegyik fehérjeváltozat a membránban volt jelen. A vad típusú és több pontmutáns SqrF fehérjét termelő törzs esetén is a fehérje túlnyomórészt a teljes sejtes és membrán frakciókban volt azonosítható (adatok nincsenek ábrázolva). A CTD mutáns SqrF fehérje is a membránhoz kötődött (**28. ábra B**).

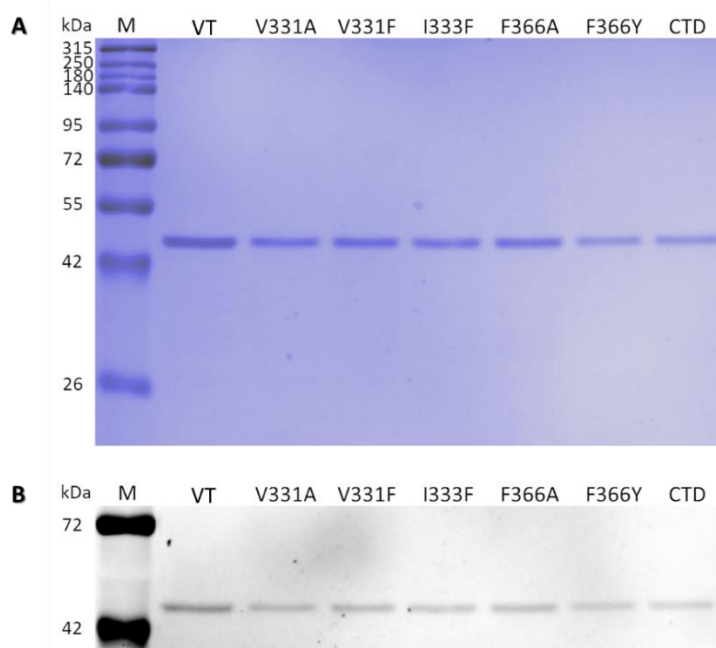


**28. ábra:** A vad típusú (A) és a C-terminális  $\alpha$ -hélix deléziós mutáns (B) SqrF fehérje sejten belüli elhelyezkedése. A fehérje termelő sejtekből izolált sejtfrakciókban az SqrF enzimek jelenléte kimutatható volt Western blot analízissel Strep II-tag specifikus antitesttel a periplazma (PF), citoplazma (CF) és membránfrakciókban (MF). Az első sáv a fehérje molekulatömeg marker (M) (Thermo Scientific™PageRuler™Plus Prestained Protein Ladder)

A nagy térfogatú (10 L) sejt kultúrákban való növesztést követően feltártuk az összegyűjtött sejteket, membránfrakciójukat izoláltuk, amiből kaotróp só kezeléssel felszabadítottuk az SqrF fehérjét. Majd a Strep II peptiddel fuzionáltatott variánsokat affinitás kromatográfiával tisztítottuk. Az I333A, dupla- és hármas mutánsokat azonban többszöri próbálkozásra sem sikerült tisztítani, annak ellenére, hogy a törzsek termelték a fehérjéket. Az 1 L sejt kultúrából tisztított SqrF enzimváltozatok mennyisége hasonló volt ( $45,5 \pm 24,9 \mu\text{g}$ ). Ezeket az eredményeket a 280 nm hullámhosszúságú fény elnyelési értékeiből kiindulva meghatározott fehérje minta koncentrációból számítottuk ki.

Az 1 L sejt kultúrából tisztított SqrF CTD mutáns fehérjék mennyisége kiemelkedően magas volt ( $320 \pm 77,8 \mu\text{g}$ ) a tisztított vad típusú SqrF enzim minták mennyiségéhez képest ( $48,2 \pm 7,7 \mu\text{g}$ ). A vad típusú és mutáns tisztított SqrF enzimeket tartalmazó minták minőségét SDS-PAGE módszerrel ellenőriztük. Ez alapján mindegyik fehérje minta nagy tisztaságúnak bizonyult. A denaturáló elektroforézis gélben az SqrF fehérjék a 44 kDa molekulatömegnek megfelelő helyzetben adtak sávot, ami megfelel az SqrF fehérjék számított molekulatömegének. Az SqrF fehérjéket tartalmazó sávon kívül az akrilamid gélben más fehérjék jelenlétére utaló sávok nem voltak láthatók (**29. ábra**).





**29. ábra:** A tisztított vad típusú (VT) és mutáns SqrF enzimvariánsok SDS-PAGE analízise. Az első zseb (M) a fehérje molekulásúly marker (Thermo Scientific™PageRuler™Plus Prestained Protein Ladder). A: Blue Silver festéssel festett gélkép az SqrF fehérje detektálására. B: A festetlen, UV fényel megvilágított SDS-PAGE gélkép a FAD kofaktor fluoreszcens jelének azonosítására

#### 4.1.3.3 Kinon kötőhely és CTD mutáns SqrF változatok spektroszkópai analízise

Megvizsgáltuk az SqrF variánsok abszorpciós spektrumát annak érdekében, hogy meghatározzuk a pontmutációk hatását az SqrF fehérje FAD kofaktor tartalmára és redox állapotára. Az egyes fehérje minták esetében megmért spektrumokat a 280 nm hullámhosszon mért abszorbancia értékekre normáltuk az összehasonlíthatóságuk érdekében, és az így összehangolt abszorbancia spektrumokat ábrázoltuk. A mutáns SqrF fehérjék abszorpciós spektrumát összevetettük a vad típusú enzim fényelnyelési mintázatával (**30. ábra**). A tDBDF család tagjai, köztük az SQR enzimek 360 és 480 nm hullámhossz között jellegzetes abszorpciós csúcsokkal rendelkeznek, amelyek a FAD kofaktor fényelnyelési maximumai (Macheroux 1999). Az összes SqrF mutáns esetén azonosíthatóak voltak ezek a csúcsok, tehát tartalmazták a kofaktort a vad típusú SqrF-hez hasonlóan (**30. ábra**).

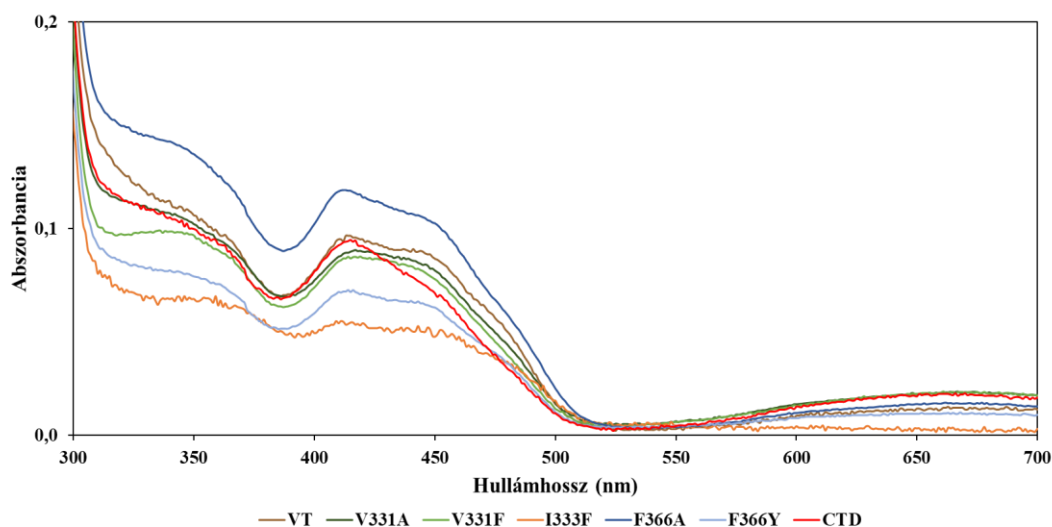
Az SDS-PAGE során a gélben elválasztott denaturált fehérjék UV fényel történő megvilágításával is vizsgálható a fehérje minták FAD kofaktor tartalma, illetve ezzel a módszerrel információ nyerhető a fehérjék kofaktor kötésének módjáról is. A denaturált állapotú SqrF fehérje minták UV gerjesztés hatására detektálható fluoreszcens emissziója is igazolja, hogy minden fehérje változat FAD kofaktort tartalmazott, ami kovalensen kötődött hozzájuk (**29. ábra**).

A fehérjék FAD tartalma annak extinkciós koefficiensének ( $11,3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  450 nm-en) a segítségével kiszámítható (Macheroux 1999; Dawson 1989). Az előállított és tisztított kinon kötőhely mutáns enzimek átlagos FAD-fehérje aránya 62% volt. Ez hasonló a vad típusú SqrF enzim értékéhez, ami esetében 1 mol tisztított SqrF fehérje 0,74 mol FAD-ot tartalmaz (Duzs és mtsai. 2018). A tisztított enzimváltozatok közül az I333F mutáns mintájában kevesebb volt a FAD-ot kötő fehérjék aránya, mivel esetükben a kofaktort tartalmazó fehérjék aránya 43%.

A 675 nm hullámhossznál mért maximum fényelnyelési értékkel azonosítható volt egy széles csúcs az SqrF fehérjék abszorpciós spektrumán (**30. ábra**), ami egy átmenetileg kialakuló kémiai szerkezetnek, a töltésátadási komplexnek (CTC) köszönhető. A CTC komplex az elektrondonor és a FAD közötti elektronátadás során kialakuló szerkezet. Ez az SQR enzimek (Mishanina és mtsai. 2015; Griesbeck és mtsai. 2002) és a II. típusú NADH:kinon oxidoreduktázok (Sena és mtsai. 2018; Sousa és mtsai. 2017) katalitikus működése során jön létre. Ha ennek a kémiai szerkezetnek az abszorpciós spektrumon magas az értéke, az arra utal, hogy az enzim katalitikus működésében eltérés lehet más enzimvariánsok működési folyamatához képest, a CTC komplex életideje hosszabb a mintákban levő enzimek nagyobb részében. A CTC komplex jelenléte vad típusú és a kinon kötőhelyben mutáns SqrF enzimekben is kimutatható volt, kivéve az SqrF I333F enzimvariáns esetén.

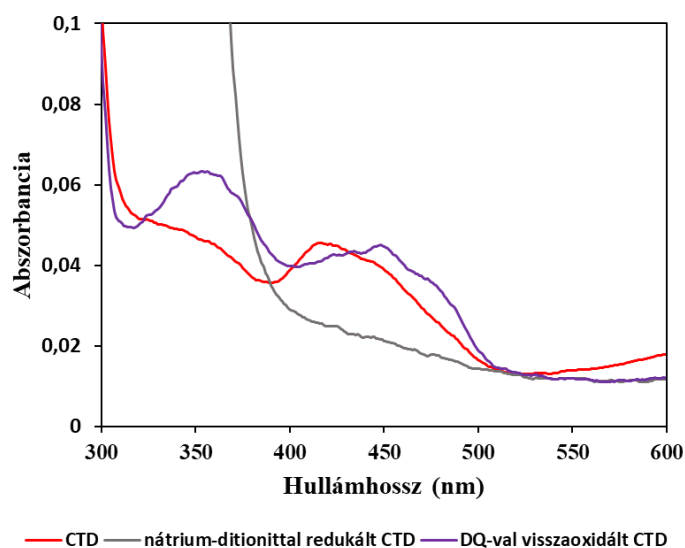
Továbbá a tisztított fehérje minták abszorpciós spektrumaiban 410 nm-nél azonosítható volt egy kis magasságú csúcs (**30. ábra**), ami egybeesik a c-típusú citokróm fehérjék fényelnyelési maximumával (a hem csoport extinkciós koefficiensén ezen a hullámhosszon  $170 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) (Blum és mtsai. 1998). A citokróm c fehérjék mennyisége az SqrF enzimhez képest azonban elhanyagolható volt a tisztított enzim mintákban, SDS-PAGE gélen a detektálási határ alá esett, ezért nem volt azonosítható az SqrF fehérjeminták mellett.

Az abszorbancia spektrum alakja a 350-500 nm hullámhossz tartományban a kofaktor oxidáltsági állapotáról is információt ad. Minél magasabb az abszorbancia érték annál nagyobb arányú az oxidált FAD-ot kötő fehérje a vizsgált mintában. A különböző minták abszorpciós spektrumait 280 nm hullámhosszra normáltuk. A vad típusú és a pontmutáns SqrF enzimek abszorpciós spektrumai a 350-500 nm tartományban hasonló formájúak voltak. Az intenzitásuk azonban eltért, aminek az oka a fehérjék eltérő koncentrációja volt. Tehát a vad típusú és pontmutáns SqrF enzimekben a kofaktor nagyrészt oxidált állapotban volt. Azonban a CTD mutáns esetén alacsonyabb volt az abszorbancia a 448 nm hullámhossz értéknél a többi SqrF fehérjével összehasonlítva. Ez arra utal, hogy magasabb arányban voltak a redukált állapotú FAD-ot kötő fehérjék a *T. roseopersicina* sejtekből tisztított deléciós mutáns fehérjék között, vagy alacsonyabb volt a mintában a FAD kofaktort kötő fehérjék aránya.



**30. ábra:** A vad típusú (VT: barna) és kinon kötőhelyben mutáns SqrF enzimvariánsok (V331A: sötétzöld, V331F: világoszöld, I333F: narancssárga, F366A: sötétkék, F366Y: világoskék, CTD: piros) abszorpciós spektrumai

A tisztított CTD mutáns redox állapotának vizsgálatához nátrium-ditionitot adtunk a fehérjéhez, amely egy erős redukálószer, és a FAD kofaktort abiotikus úton hatékonyan képes redukálni, a fehérje mintában levő összes SqrF fehérjét redukált állapotúvá alakítva. Ezt követően DQ hozzáadásával az enzim minta teljesen oxidált állapotba került. Utóbbi hozzáadását követően 360 és 448 nm hullámhosszaknál újra megjelent az abszorpciós csúcs és a korábbtól eltérő formát vett fel a CTD variáns spektrumában. A citokróm c fehérje jelenlétére utaló 410 nm-es csúcs is eltűnt a nátrium-ditionit hozzáadását követően. Ez a csúcs azonban az oxidáció után nem volt azonosítható, tehát az SqrF fehérjék abszorpciós spektrumához hozzáadódó csúcsot okozó, a tisztított fehérje mintákban feltehetően jelen levő fehérje képes volt reagálni ditionittal, azonban DQ-t nem használta szubsztrátként (**31. ábra**).



**31. ábra:** A C-terminális  $\alpha$ -hélix deléciós mutáns SqrF abszorpciós spektruma a tisztítást követő (piros), a nátrium-ditionittal redukált (szürke) és a DQ-val oxidált (lila) állapotban

#### 4.1.3.4 A tisztított kinon kötőhely és CTD mutáns SqrF fehérjék szulfid-függő kinon redukáló aktivitása

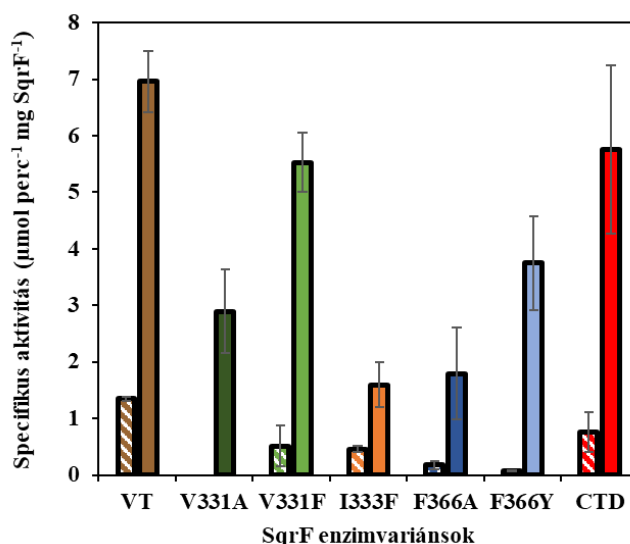
Kutatócsoportunk korábban felderítette, hogy a *T. roseopersicina* SqrF enzim az ubikinon típusú kinonokkal mutatja a legnagyobb aktivitást, különösen DQ-val és dUQ-val (Duzs és mtsai. 2018). Az enzim kinon kötőhelyét érintő mutációk hatásának részletesebb vizsgálata érdekében a pontmutáns és CTD SqrF enzimeknek megmértük a szulfid függő kinon redukáló aktivitását mindkét kinonnal (**32. ábra**). A vad típusú enzimhez képest mindegyik variáns alacsonyabb aktivitást mutatott.

Az SqrF V331A mutánsnak nem volt DQ redukáló aktivitása, dUQ-val pedig kevesebb, mint a fele volt (42%) a vad típusú SqrF enzim aktivitásának. Az SqrF V331F csere csökkentette az aktivitást DQ alkalmazásával (64%), de dUQ szubsztráttal kisebb mértékű volt az aktivitás csökkenése (79%), mint a V331A esetén (**32. ábra**).

Az SqrF I333F mutáns DQ-val mért aktivitása 64%-a volt a vad típusénak. Továbbá ez a variáns rendelkezett a legalacsonyabb specifikus aktivitással dUQ szubsztráttal mérve (23%) az összes mutánssal összehasonlítva (**32. ábra**).

A legnagyobb mértékű aktivitás csökkenést DQ szubsztrát alkalmazásával a Phe366 aminosav alaninnal és tirozinnal való helyettesítése eredményezte. Az SqrF F366A aktivitása 13%-a, az SqrF F366Y variáns aktivitása pedig 6%-a volt a vad típusú SqrF enzimének. A Phe366 aromás aminosavra cserélése azonban kisebb hatással volt a szulfid függő dUQ redukcióra (54%), mint az alaninnal való helyettesítés (26%) (**32. ábra**).

A C-terminális  $\alpha$ -hélix teljes eltávolítása kevésbé volt hatással az aktivitásra, mint az  $\alpha$ -hélixen elhelyezkedő Phe366 megváltoztatása (F366A, F366Y). A CTD variáns aktivitása DQ szubsztrát alkalmazásával kb. 44%-kal, valamint dUQ szubsztráttal kb. 17%-kal csökkent a vad típushoz képest (**32. ábra**).



**32. ábra:** A tisztított vad típusú és SqrF mutánsok szulfid függő DQ (csíkos oszlopok) és dUQ (egyszínű oszlopok) redukáló specifikus aktivitása

#### 4.1.3.5 Kinon kötőhely és C-terminális $\alpha$ -hélix mutáns SqrF enzimek kinetikai paramétereinek meghatározása

Az SqrF enzimvariánsok kinetikai paramétereit is vizsgáltuk a kinon kötőhelyet alkotó aminosavak szerepének megismerése érdekében. Az enzimek összehasonlítására használt mérési körülmények alkalmazásával (3.5.5 fejezet) különböző DQ és dUQ koncentrációk mellett megmértük az enzimek aktivitását. A mért értékekre nem-lineáris regressziós módszerrel illesztett görbék (3.5.6 fejezet) alapján meghatároztuk az egyes enzimvariánsokra jellemző katalitikus sebességi állandót ( $k_{cat}$ ), az összes SqrF variáns maximális sebességének a feléhez tartozó szubsztrát koncentrációt. Továbbá meghatároztuk a Michaelis-Menten konstanst ( $K_m$ ), ami az enzim affinitásának mértéke a szubsztráthoz, valamint a kinon redukáló aktivitás katalitikus hatékonyságát ( $k_{cat}/K_m$ ). Ezeket összehasonlítottuk a vad típusú SqrF enzim meghatározott enzimkinetikai paraméter értékeivel (**1. táblázat**).

**1. táblázat:** A vad típusú és mutáns SqrF enzimek kinetikai paramétereit és aktivációs energiáit

Fehérje	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )		$K_m$ ( $\mu M$ )		$k_{cat}/K_m$ ( $\mu M^{-1}s^{-1}$ )		Aktivációs energia ( $kJ K^{-1} mol^{-1}$ )
	DQ	dUQ	DQ	dUQ	DQ	dUQ	
<b>SqrF VT</b>	1.25±0.04	8.37±0.33	27.39±2.47	24.47±6.42	0.046	0.342	35.8
<b>SqrF V331A</b>	0	2.47±0.33**	n.a.	18.99±6.10	n.a.	0.130	48.5
<b>SqrF V331F</b>	0.72±0.02**	3.64±1.06**	40.23±7.36*	12.33±0.86*	0.018	0.295	66.7
<b>SqrF I333F</b>	0.72±0.21*	1.20±0.48**	102.7±69.9	13.98±7.20	0.007	0.086	66.2
<b>SqrF F366A</b>	0.26±0.01**	1.97±0.28**	46.19±2.53**	9.38±1.97*	0.006	0.210	67.2
<b>SqrF F366Y</b>	0.57±0.08**	3.17±0.82**	79.30±14.68**	10.03±1.39*	0.007	0.316	52.3
<b>SqrF CTD</b>	0.96±0.24	4.90±0.80**	70.71±44.78	18.99±0.67	0.014	0.268	84.2

p≤0,01, \*\*p≤0,001; n.a: nincs adat

A  $k_{cat}$  értékek összhangban voltak az SqrF variánsok 4.1.3.4 fejezetben leírt módon meghatározott specifikus aktivitás értékeivel. Minden variáns esetében a szulfid-függő kinon redukció lassabban ment végbe, mint a vad típusú SqrF fehérjénél.

Az összes enzimváltozat esetében nőtt azok DQ szubsztrátra vonatkozó  $K_m$  értéke, tehát csökkent az affinitásuk ehhez a kosubsztráthoz, valamint a katalitikus hatékonyságuk is jelentősen esett a vad típusú SqrF-hez képest. A mutánsok affinitása a dUQ-hoz azonban egyik esetben sem csökkent.

Az SqrF V331A  $K_m$  értéke hasonló volt a vad típusúhoz, katalitikus hatékonysága azonban jelentősen csökkent. Ezzel ellentétben a V331F csere a dUQ szubsztráthoz nagyobb affinitást mutató enzimet eredményezett az alanin mutánssal összehasonlítva, katalitikus hatékonysága pedig a vad típusú enziméhez volt hasonló (**1. táblázat**).

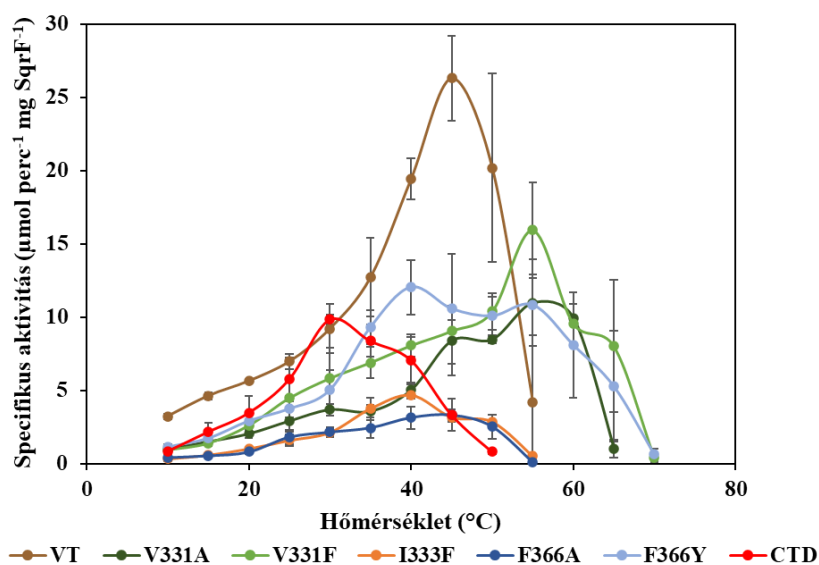
Az SqrF I333F enzimvariáns  $K_m$  értéke kisebb volt, mint a vad típusú SqrF fehérje esetében mért, tehát nőtt az affinitása dUQ-hoz. Azonban ebben az esetben volt a legalacsonyabb a katalitikus hatékonyság a többi változattal összevetve (**1. táblázat**).

Az SqrF F366A és az SqrF F366Y mutánsok  $K_m$  értéke egymáshoz nagyon hasonló volt. Mindkettő jelentősen alacsonyabb volt a vad típusú SqrF enzim dUQ alkalmazásával mért  $K_m$  értékéhez, vagyis számottevően nagyobb volt az affinitásuk a dUQ szubsztráthoz a vad típussal összehasonlítva. Az SqrF F366A  $k_{cat}/K_m$  értéke kisebb volt, mint a vad típusú SqrF enzimé. Azonban az SqrF F366Y katalitikus hatékonysága volt a legmagasabb az előállított kinon kötőhelyben mutáns fehérjék közül, és szinte azonos volt a vad típusú enziméhez (**1. táblázat**).

A C-terminális  $\alpha$ -hélix eltávolításával a dUQ szubsztráthoz való affinitás és a katalitikus hatékonyság nem változott jelentősen a vad típushoz képest (**1. táblázat**).

#### 4.1.3.6 Kinon kötőhely és C-terminális $\alpha$ -hélix mutáns SqrF enzimek aktivitásának hőmérséklet függése, aktiválási energiái

Vizsgáltuk az SqrF enzimvariánsok aktivitásának hőmérséklet függését a kinon kötő csatornát kialakító aminosavak funkciójának részletesebb megismerése céljából. Ennek érdekében a különböző SqrF mutánsok szulfid függő dUQ redukáló aktivitását különböző hőmérsékleteken mértük meg (**33. ábra**). Az enzimek összehasonlítására alkalmazott mérési körülményeket használtuk (3.5.5 fejezet) 10-70 °C hőmérséklettartományban. Ezeket a vad típusú SqrF enzim hőmérsékletfüggés görbéjével vetettük össze, ami a maximális aktivitást 45 °C hőmérsékleten mutatta.



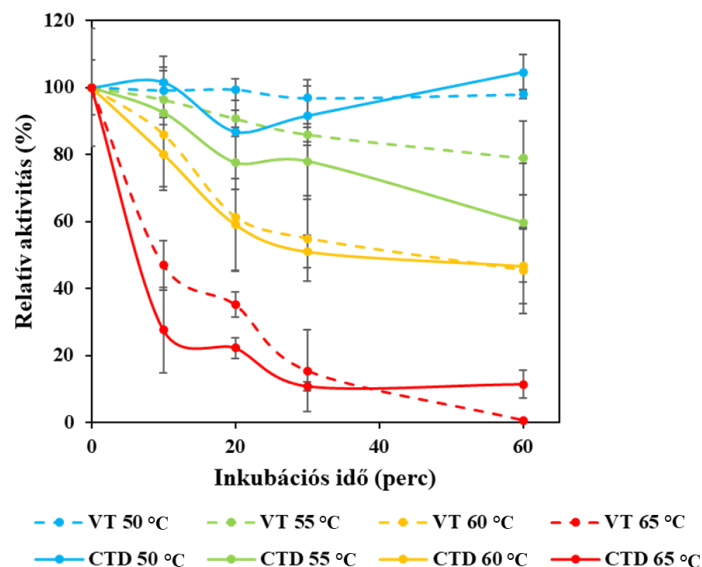
**33. ábra:** A vad típusú és SqrF enzimvariánsok szulfid függő dUQ redukáló aktivitásuk hőmérsékletfüggése

Az összes mutáció csökkentette az enzimvariánsok maximális aktivitását, bár eltérő mértékben. A Val331 aminosav alaninra és fenilalaninra cserélése a fehérjében 55 °C-ra emelte az SqrF enzim maximális aktivitásának a hőmérsékletét. Az SqrF I333F enzimváltozat és a Phe366 mutánsok esetében (F366A, F366Y) alacsonyabb hőmérsékleten (40-45 °C) volt a legmagasabb az enzim aktivitása. A C-terminális  $\alpha$ -hélix eltávolítása eredményezte a legalacsonyabb hőmérsékleti optimumot, ami 30 °C volt.

Az SqrF enzimvariánsok aktivációs energiáit az enzimeknek a *T. roseopersicina* sejtek számára fiziológiás hőmérséklet tartományban (10-35 °C között) mért szulfid függő dUQ redukáló aktivitás értékek linearizálásával, a meredekségéből számoltuk ki (3.5.7 fejezet) (**1. táblázat**). Mindegyik SqrF mutánsnak magasabb volt az aktivációs energiája, mint a vad típusú enzimé. A legkisebb emelkedés az SqrF V331A és az SqrF F366Y mutánsoknál volt megfigyelhető, a legmagasabb aktivációs energiája az SqrF CTD mutánsnak volt, több mint kétszerese a vad típusú *T. roseopersicina* SqrF enzim aktivációs energiájának.

#### 4.1.3.7 A C-terminális $\alpha$ -hélix mutáns SqrF enzim hőstabilitása

Az SqrF enzimváltozatok aktivitásának hőmérsékletfüggése alapján a C-terminális  $\alpha$ -hélix deléciós mutáns aktivitása nagyobb mértékben hőérzékeny, mint a többi mutáns. Az ok kiderítése érdekében vizsgáltuk az SqrF CTD mutáns hőstabilitását. Ehhez az enzimminták aktivitásának változását követtük nyomon különböző hőmérsékleti értékeken történő inkubációjuk során. Az SqrF CTD variánst és a vad típusú SqrF enzim mintáit különböző hőmérsékleten (50-65 °C), különböző időtartamon keresztül (0-60 perc) inkubáltuk. Majd a kezelt enzimmintákat 25°C-ra visszahűtöttük és mértük az aktivitásukat. A C-terminális  $\alpha$ -hélix jelenlétében és hiányában is hasonló volt az SqrF enzim hőstabilitása (**34. ábra**).





**34. ábra:** A vad típusú (szaggatott vonalak) (Duzs és mtsai. 2018) és az SqrF CTD mutáns (egyszínű vonalak) SqrF enzimek hőstabilitása. A különböző hőmérsékleteken (50-65 °C) történő inkubáció fehérjékre gyakorolt hatásának vizsgálata dUQ redukáló aktivitásuk 60 perc időtartam alatti meghatározásával történt. Inkubációs hőmérsékletek: 50 °C (kék), 55 °C (zöld), 60 °C (sárga), 65 °C (piros)

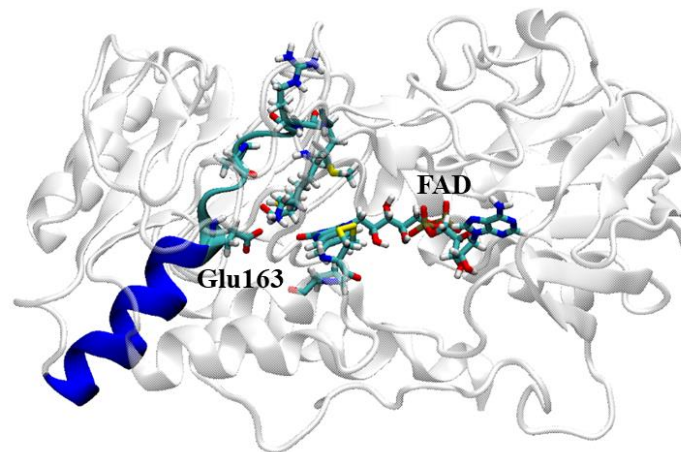
#### **4.2 *T. roseopersicina* SqrF Glu163 enzimműködésben játszott szerepének feltérképezése**

A csoportunk által korábban jellemzett konzervált ciszteineken, valamint az 5.1 fejezetben bemutatott módon részletesen vizsgált kinon kötőhelyen található konzervált apoláris aminosavakon kívül más aminosavak is szerepet játszhatnak az SQR enzimek katalitikus működésében. Ilyen lehet az SQR enzimek aktív centrumában elhelyezkedő glutaminsav, ami az SQR fehérjék között nagymértékben konzervált. Homológja a *T. roseopersicina* SqrF enzimben is megtalálható (Glu163) (**8. ábra**).

Az *R. capsulatus* SqrA enzimben szintén jelen van ez a glutaminsav (Glu165) (**8. ábra**) és az enzim működési modellje szerint a szulfid oxidációs lépésben a proton transzfer folyamatában játszhat szerepet (Griesbeck és mtsai. 2002). Ennek ellenére nagyon kevés információval rendelkezünk az SQR enzimek aktív centrumában levő glutaminsavnak a katalízisben betöltött szerepéről. Ezt kísérletes módszerekkel még egy SQR enzim esetében sem vizsgálták. Nem készültek a glutaminsavban mutáns enzimváltozatok, amelyek jellemzése lehetővé tehetné az aminosav katalitikus szerepének felderítését.

##### **4.2.1 A Glu163 mutáns *T. roseopersicina* SqrF enzimvariánsokat termelő törzsek létrehozása**

A *T. roseopersicina* SqrF enzim Glu163 aminosav katalitikus mechanizmusban betöltött szerepének vizsgálatát, funkciójának megismerését a glutaminsav cseréjével létrehozott mutánsokon tanulmányoztuk. A Glu163 karboxil csoportja az aktív centrumában helyezkedik el a FAD kofaktor és a Cys332 közelében (**35. ábra**). Az utóbbi aminosavról korábbi vizsgálataink kimutatták, hogy szerepet játszik a szulfid oxidáció folyamatának katalízisében.



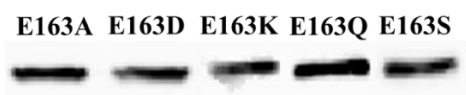
**35. ábra:** *T. roseopersicina* SqrF homológia modellje a Glu163, valamint a FAD kofaktor jelölésével

A Glu163 aminosavat kémiai tulajdonságaikban, töltésükben, polaritásukban vagy méretükben hasonló, illetve eltérő aminosavakkal helyettesítettük. A glutaminsav negatív töltésű savas aminosav, amit alaninra, aszparaginsavra, lizinre, glutaminra és szerinre cseréltünk ki egyes SqrF fehérje változatokban. Az alanin a legegyszerűbb, apoláris aminosav, amelynek rövid oldallánca egyetlen metil-csoport. Az aszparaginsav savas, negatív töltésű, csak méretében tér el a glutaminsavhoz képest. A lizin bázikus oldalláncú, pozitív töltésű aminosav, amely nagyobb méretű, mint a glutaminsav, valamint az SqrB csoportba tartozó eukarióta SQR fehérjékben konzerváltan ez az aminosav található. A glutamin poláros, töltéssel nem rendelkező aminosav. A szerin szintén poláros, nem rendelkezik töltéssel, azonban kisebb méretű a glutaminsavnál.

A glutaminsav mutánsokat hasonló módszerrel hoztuk létre, mint a kinon kötőhely aminosav mutáns enzimvariánsokat (3.3.9 fejezet). Így készültek el a mutáns törzsek: FRNSQNNE163A, FRNSQNNE163D, FRNSQNNE163K, FRNSQNNE163Q, FRNSQNNE163S.

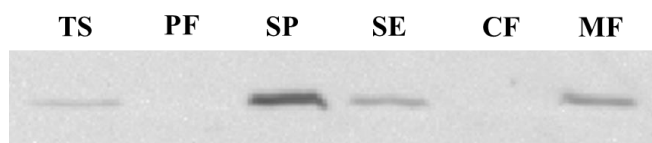
#### 4.2.2 A Glu163 mutáns SqrF fehérjék termeltetése és tisztítása

A Glu163 mutáns SqrF enzimváltozatokat expresszáló *T. roseopersicina* törzseket felnevesztettük a 3.1.2 fejezetben részletezett módszerrel. Az izolált párhuzamos, stabil transzformáns, SqrF expresszáló sejtvonalak fehérje termelő képességében eltérések voltak. A Western blot analízis alapján a legtöbb fehérjét tartalmazó minták sejtvonalait használtuk a fehérjék előállítására (36. ábra).



**36. ábra:** A Glu163 mutáns SqrF enzimváltozatokat expresszáló *T. roseopersicina* sejtvonalak fehérjetermelő képessége. A különböző Glu163 mutáns fehérjék jelenléte a sejt kultúrákból vett mintákban Western hibridizációval Strep II antitest alkalmazásával vizsgálva

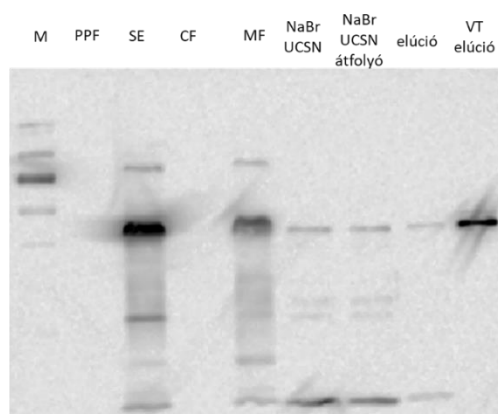
Ezt követően nagy mennyiségű biomasszát állítottunk elő a legjobb fehérje termelő képességgel rendelkező törzsekből. A különböző frakciók (teljes sejt, periplazma, szferoplaszt, sejt extraktum, citoplazma, membrán frakció) Western blot hibridizációjával azonosítottuk, hogy a különböző SqrF Glu163 variáns fehérjék mely frakciókban voltak jelen (**37. ábra**, **38. ábra**). A sejtmembránt NaBr kezeléssel szolubilizáltuk, majd affinitás kromatográfiával tisztítottuk a különböző SqrF variánsokat. Az SqrF E163K mutánst expresszáló sejtekből izolált membrán minták tartalmazták ugyan a fehérjét (**36. ábra**), de ezt a változatot az alkalmazott affinitás kromatográfiás eljárással tisztítani többszöri próbálkozásra sem sikerült.



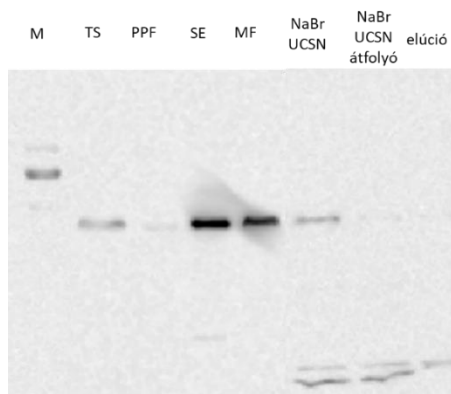
**37. ábra:** Az egyes sejtfrakciókban jelen lévő *T. roseopersicina* SqrF E163K mutáns fehérje kimutatása Western blot analízissel (TS: teljes sejt, PF: periplazma frakció, SP: szferoplaszt, SE: sejt extrakt, CF: citoplazma frakció, MF: membrán frakció)

Az SqrF E163D variánsból több sejtvonallal többször megismételve sikerült fehérjét tisztítani. Az affinitás kromatográfiás tisztítás után azonban nemcsak az elúció, de az átfolyó is nagy mennyiségben tartalmazott rekombináns SqrF fehérjéket, tehát az SqrF enzim kis hányada kötődött fel az oszlopra. Továbbá az SqrF E163D elúcióban jelentősen kevesebb SqrF fehérje volt detektálható, mint a vad típusú enzim esetében (**38. ábra**).

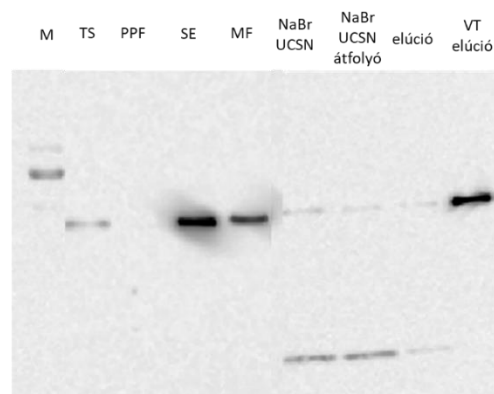
## E163D/5/1



## E163D/5/2

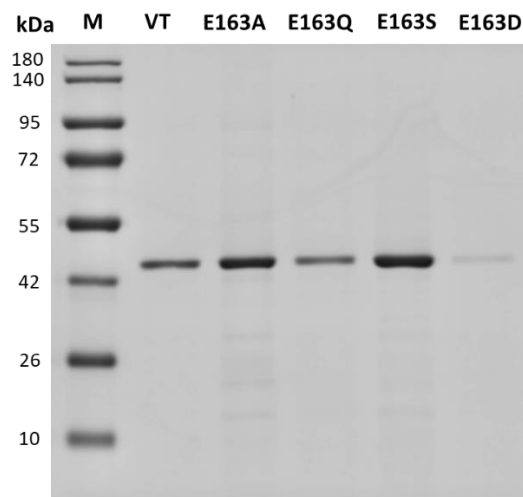


## E163D/10



**38. ábra:** Különböző SqrF E163D sejtvonalak fehérje termeltetése és tisztítási folyamata közben gyűjtött frakciók Western-blot analízise. (TS: teljes sejt, PPF: periplazma frakció, SE: sejt extrakt, CF: citoplazma frakció, MF: membrán frakció, NaBr UCSN: NaBr kezelés és ultracentrifugálás utáni felülúszó frakció, NaBr UCSN átfolyó: az NaBr kezelt, ultracentrifugált felülúszó affinitás kromatográfián áteresztett frakciója, elúció: affinitás kromatográfiával tisztított fehérje frakció, VT elúció: vad típusú SqrF tisztított fehérje frakció). M: fehérje molekulásúly marker (Thermo Scientific™PageRuler™Plus Prestained Protein Ladder)

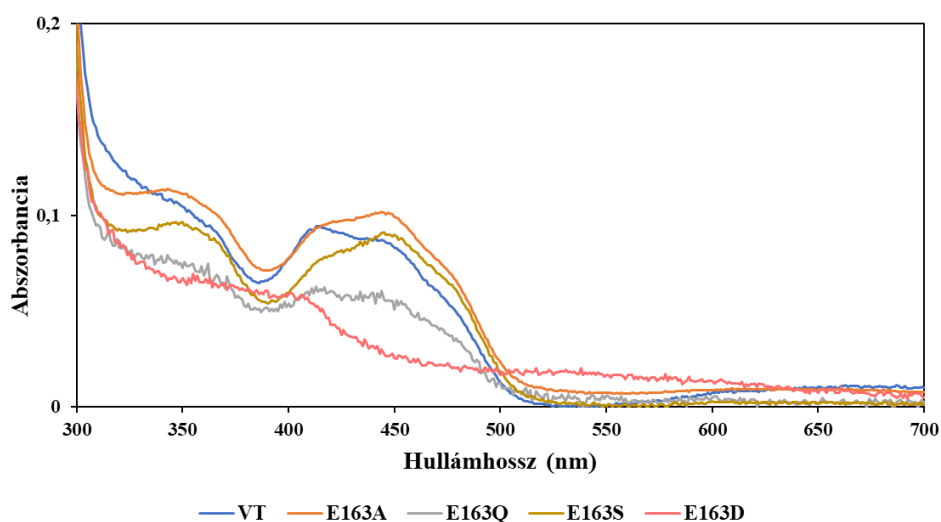
A vad típusú és tisztított SqrF E163A, E163D, E163Q és E163S enzimeket tartalmazó minták minőségét SDS-PAGE-el ellenőriztük. Ez alapján az SqrF fehérje minták nagy tisztaságúak voltak, azonos, 44 kDa molekulásúly magasságban jelentek meg a vad típusú és mutáns SqrF fehérjék is (**39. ábra**). A fehérjeminták koncentrációját a 280 nm hullámhosszon mért fényelnyelési értékekre normált abszorpciós spektrumokból (**40. ábra**) számoltuk ki. A mintákból 1 µg fehérjét vittünk fel. Az SqrF E163D mutáns koncentrációja az abszorpciós spektrum 280 nm csúcs alapján magasabb volt a valódi koncentrációnál. Ugyanis, SDS-PAGE gélképen sokkal kevesebb a detektálható fehérje összehasonlítva a vad típusú SqrF fehérjével (**39. ábra**). Ez arra utal, hogy az SqrF E163D tisztított minta tartalmaz valamilyen szennyeződést, ami ugyanezen a 280 nm-es fényelnyelési maximumon abszorbeál.



**39. ábra:** Az 1 µg vad típusú (VT) és a tisztított Glu163 mutáns SqrF enzimek vizsgálata SDS-PAGE analízissel. Az első oszlop (M) a fehérje molekulaszúly marker (Thermo Scientific™PageRuler™Plus Prestained Protein Ladder)

#### 4.2.3 Glu163 mutáns *T. roseopersicina* SqrF változatok spektroszkópiai analízise

A Glu163 tisztított SqrF variáns fehérjék abszorbancia spektrumának felvételével vizsgáltuk a FAD tartalmukat és a fehérjék redox állapotát. Összevethetőségük érdekében a vad típusú és mutáns SqrF spektrumokat ebben az esetben is a 280 nm-en mért abszorbancia értékeik alapján normáltuk. Ha az enzimmintában található FAD, akkor a kofaktor fényelnyelésének maximumai 360-480 nm közötti hullámhossz tartományban azonosíthatóak a spektrumon. Az SqrF E163A, E163Q és E163S mutánsok abszorbancia spektrumában láthatóak voltak az oxidált kofaktorok fényelnyelése miatt kialakuló csúcsok. Tehát ezekben a fehérjeváltozatokban a vad típusú SqrF-hez hasonlóan jelen volt a FAD. Az SqrF E163D spektruma teljesen eltért a többi enzimétől, a kofaktor fényelnyelési maximumai egyáltalán nem voltak azonosíthatóak, tehát az enzimnek ez a változata valószínűleg nem tartalmazott FAD-ot (**40. ábra**). Az abszorpciós spektrum 350-500 nm tartománya a kofaktor oxidáltsági állapotáról ad információt. Az SqrF E163A és E163S mutánsok teljesen oxidált állapotban voltak, ugyanis magasan jelentek meg a kofaktor fényelnyelési csúcsai (**40. ábra**). A vad típusú SqrF enzim kevésbé volt oxidált állapotú összehasonlítva a két variánssal. Az SqrF E163Q mutáns spektruma eltért a többi variánsétól. Ennek a variánsnak alacsonyabbak voltak a csúcsok a kofaktor fényelnyelési maximumainál. Ennek az oka az lehet, hogy alacsonyabb arányú volt a FAD kötő fehérje jelenléte a vizsgált tisztított fehérje mintákban, vagy redukáltabb állapotban lévő kofaktor kötő fehérjék voltak jelen (**40. ábra**).

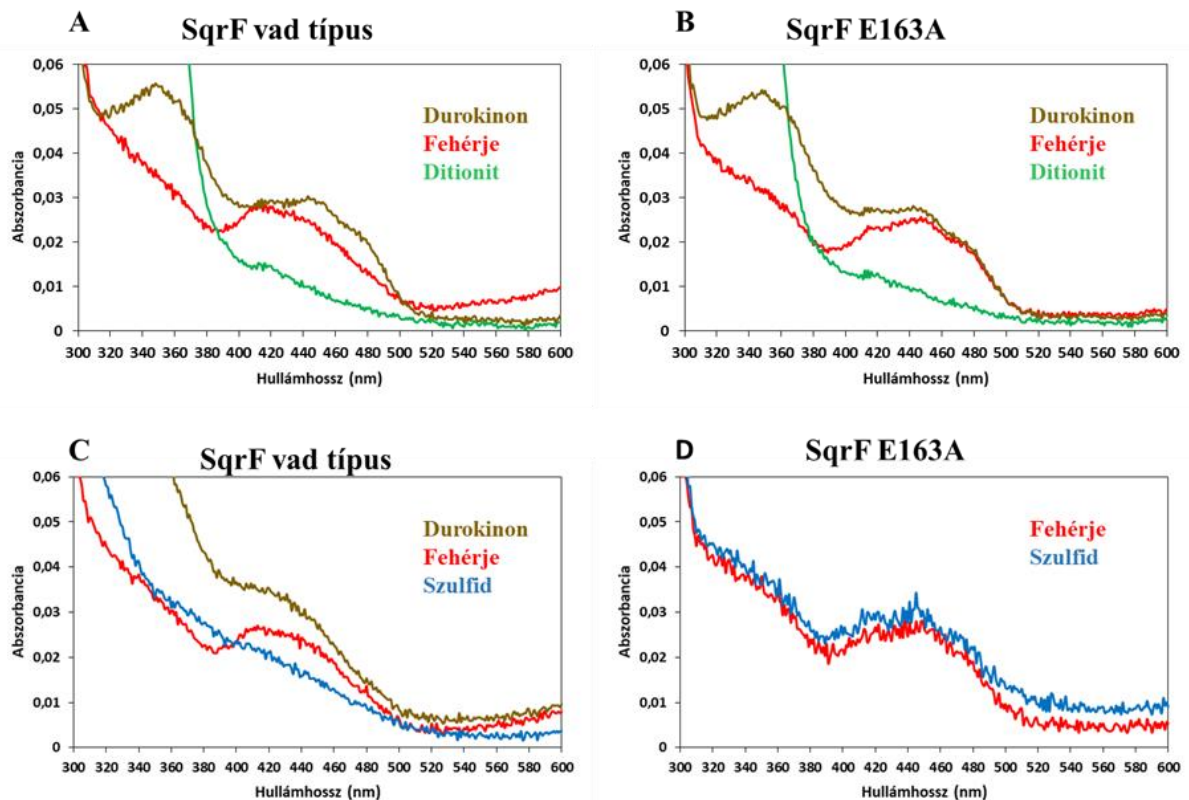


**40. ábra:** A vad típusú (VT: kék) és SqrF Glu163 enzimvariánsok (SqrF E163A: narancssárga, SqrF E163Q: szürke, SqrF E163S: mustársárga, SqrF E163D: rózsaszín) abszorpciós spektrumai

Mindegyik abszorpciós spektrumon azonosítható volt 410 nm-nél egy csúcs (**40. ábra**), amelyet ezeknél a fehérje mintáknál is feltételezhetően a citokróm-c fehérje jelenléte okozhat, mint a többi tisztított SqrF mintánál. Ennek a mennyisége az SqrF enzimhez képest azonban elhanyagolható volt, a megfestett SDS-PAGE gélen (**39. ábra**) a detektálási határ alá esett, ezért nem volt azonosítható az SqrF fehérjeminták mellett.

#### 4.2.3.1 Az SqrF E163A mutáns fehérjék redukálhatósága

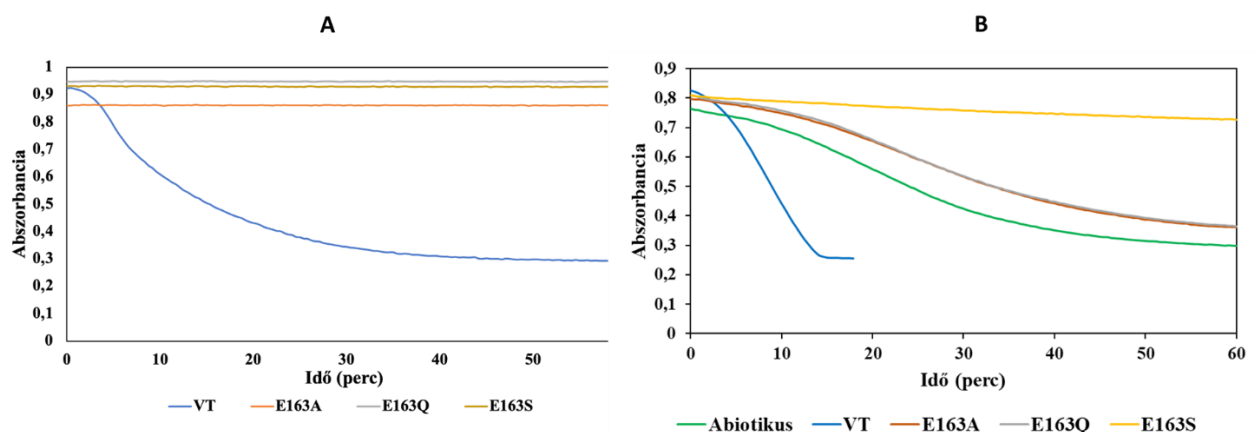
Meghatároztuk a vad típusú és SqrF E163A mutáns fehérjék fényelnyelési spektrumát 300-600 nm hullámhossztartományban a FAD redox állapotának azonosítása és ennek a glutaminsavnak a további funkcionális vizsgálata érdekében. Mindkét SqrF variáns tartalmazta a kofaktort. Kétféleképpen redukáltuk a fehérjéket. Az egyik esetben nátrium-ditionitot adtunk hozzájuk. Ennek hatására a vad típusú és a mutáns SqrF minták teljes fehérjetartalma redukált állapotba került. Ezt az oxidált állapotú FAD molekulákra jellemző, a 360 és 450 nm-nél azonosítható spektrum csúcsok megszűnése jelezte (**41. ábra A, B**). Az ilyen módon redukált fehérjék oxidálásához DQ elektronakceptort alkalmaztunk. Ennek a hatására mindkét enzimváltozat mintáiban levő összes fehérje oxidált állapotba került. Ugyanis a kezelést követően az oxidált állapotú kofaktort jellemző csúcsok ismét azonosíthatóak voltak az abszorbancia spektrumokban (**41. ábra A, B**). Ha a fehérjékhez redukálószerként a természetes szubsztrátját, a szulfidot adtuk, akkor redukált állapotba került az összes vad típusú SqrF fehérje, majd DQ hozzáadásával ismét oxidált állapotú volt a kofaktor (**41. ábra C**). Azonban az SqrF E163A mutáns spektruma nem változott a szulfid hozzáadását követően, ugyanolyan oxidált állapotú maradt a FAD (**41. ábra D**).



**41. ábra:** A vad típusú és SqrF E163A fehérjék redukálhatósága és oxidálása. Tisztított formában, a tisztítás pillanatának megfelelő oxidált állapotban lévő fehérjék (piros, A, B, C, D), nátrium-ditionittal redukált vad típusú (zöld, A) és SqrF E163A (zöld, B) fehérjék, szulfiddal redukált vad típusú (kék, C) és SqrF E163A (kék, D) enzimek, DQ-val oxidált vad típusú (barna A, C) és SqrF E163A fehérjék (barna, B)

#### 4.2.4 A Glu163 variáns SqrF fehérjék szulfid-függő kinon redukáló aktivitása

A Glu163 variáns SqrF enzimek redox állapotára és redukálhatóságuk vizsgálatának eredményeire alapozva megmértük a szulfid függő kinon redukáló aktivitásukat. Ezeket mind DQ-val, mind dUQ-val meghatároztuk a további funkcionális vizsgálatok érdekében.



**42. ábra:** A vad típusú (kék) és SqrF Glu163 mutáns (SqrF E163A: narancssárga, SqrF E163Q: szürke, SqrF E163S: mustársárga, abiotikus: zöld) fehérjék DQ (A) és dUQ (B) redukáló aktivitása

A különböző SqrF Glu163 enzimvariánsoknak nem volt DQ redukáló aktivitása. Ezzel ellentétben a vad típusú SqrF enzim katalizálta a szulfid-függő kinon redukciót (**42. ábra A**).

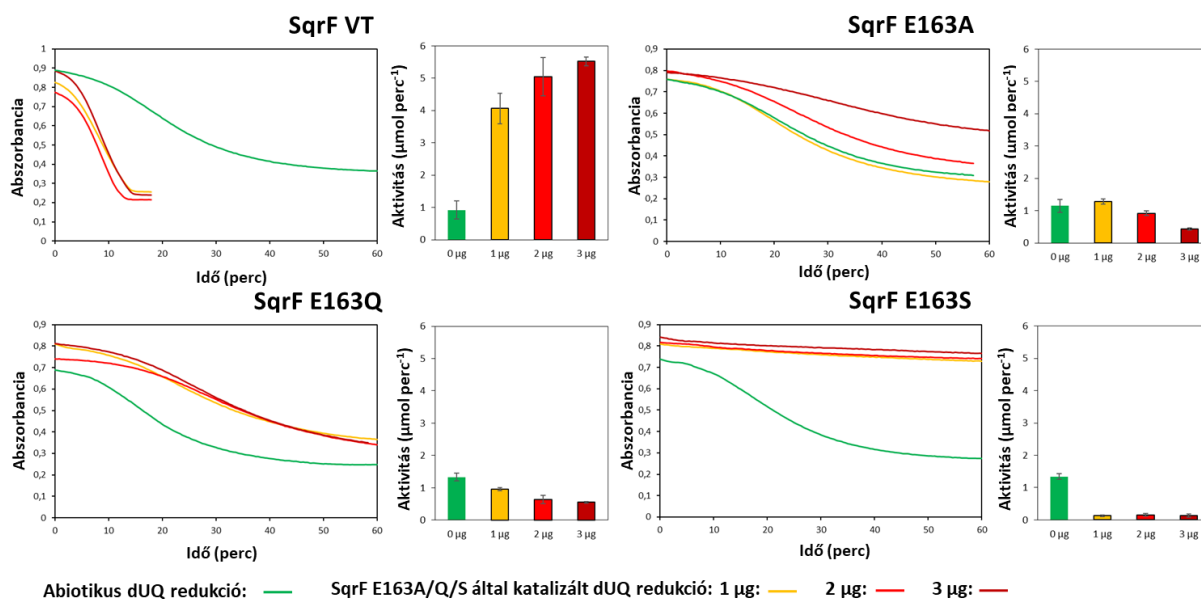
Csoportunk korábbi eredményei alapján tudjuk, hogy a vad típusú enzim körülbelül ötször nagyobb sebességgel redukálja a dUQ-t, mint a DQ-t (Duzs és mtsai. 2018). A dUQ képes közvetlenül redukálódni az enzim jelenléte nélkül is az elektrondonor, szulfid hatására. Ezt a reakciót nevezzük abiotikus kinon redukciónak. Az SQR típusú fehérjék katalitikus aktivitásának következtében a szulfid-függő kinon redukció az enzim jelenlétében az abiotikus redox reakciónál nagyobb sebességgel megy végbe. Emiatt, ha dUQ-t alkalmazunk az SQR enzimek aktivitás mérése során elektronakceptor szubsztrátként mindig szükség van egy abiotikus kontroll reakcióra, amiben csak a szubsztrátok, szulfid és dUQ vannak jelen. Az enzim aktivitásának meghatározásához az abiotikus úton történő dUQ redukció sebességét ki kell vonni az enzim jelenlétében végbemenő kinon redukció folyamatának sebességéből.

A glutaminsav mutáns SqrF enzimek esetén dUQ alkalmazásával egy szokatlan aktivitás volt megfigyelhető, amit más vizsgált vad típusú és mutáns SQR enzimek esetén nem mutattak ki. Az SqrF Glu163 variánsok vagy az abiotikus reakcióval közel azonos sebességgel katalizálták a kinon redukciót vagy még az abiotikus reakciónál is kisebb sebességű volt a dUQ redukció (**42. ábra B**).

#### **4.2.4.1 A Glu163 mutáns SqrF enzimek katalitikus aktivitásának függése az enzimkoncentrációtól**

A Glu163 aminosavban mutáns SqrF fehérjék jelenlétében megfigyelhető volt az abiotikus reakciónál kisebb sebességű kinon redukció. Ennek a további tanulmányozásához különböző mennyiségű enzimekkel vizsgáltuk a dUQ redukció folyamatát. Az enzimek összehasonlítására használt mérési körülmények között 1 µg fehérje került a reakcióelegybe. Emellett vizsgáltuk 2 és 3 µg fehérje hozzáadásával a kinon redukció sebességét. Valamint minden kísérlet mellett kontrollként szerepelt egy abiotikus reakció.





**43. ábra:** A dUQ redukció sebessége különböző mennyiségű SqrF enzimváltozatok jelenlétében. A vonaldiagramokon a dUQ redukció kinetikája került ábrázolásra. Az oszlopdiagramokon a mért kinon redukáló aktivitások láthatóak. A zöld jelöli az abiotikus kinon redukciót. A sárga az 1 µg, a piros a 2 µg, a bordó a 3 µg enzimmal mért aktivitást jelöli

A vad típusú SqrF fehérje aktivitása az enzimmennyiség növelésével emelkedett. Valamint már az 1 µg enzimmal mért kinon redukciójának a sebessége is jelentősen magasabb volt, mint az abiotikus reakcióban végbemenő dUQ redukció sebessége (**43. ábra VT**).

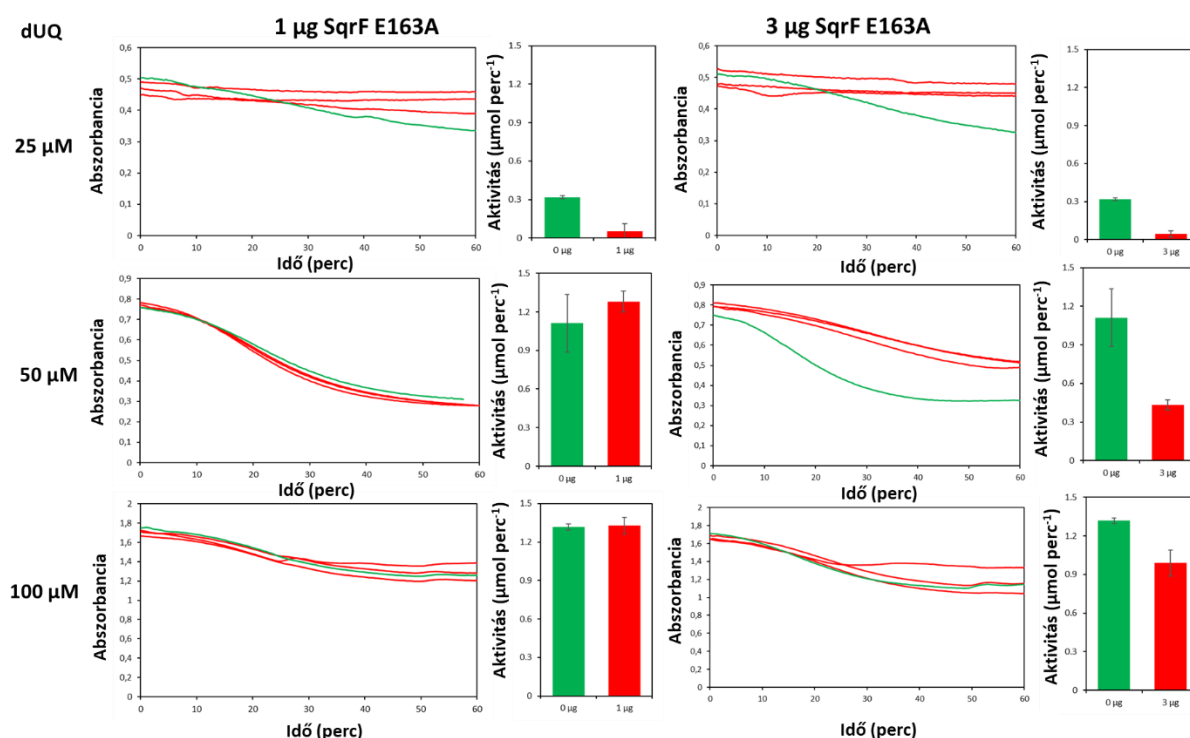
Az SqrF E163A mutáns aktivitása 1 µg enzimmal nagy mértékben csökkent a vad típushoz képest, közel azonos volt az abiotikus reakcióval. Az enzimmennyiség növelésével pedig az abiotikus reakciónál lassabb reakció ment végbe (**43. ábra SqrF E163A**).

Az SqrF E163Q variáns esetén már 1 µg enzimmal is az abiotikusnál lassabb dUQ redukáló reakció játszódott le. Az enzimmennyiség kétszeresére növelésével az abiotikus reakciónál még lassabb volt a reakció, viszont 3 µg enzim mellett már nem lassult tovább (**43. ábra SqrF E163Q**).

Az SqrF E163S mutánsnál a leglassabb a dUQ redukció sebessége az abiotikus és többi variáns aktivitásával összehasonlítva. A reakcióelegyben a legkisebb mennyiségben alkalmazott enzim jelenléte esetén is minimális, nullát megközelítő a dUQ redukció sebessége. Ez az aktivitás nem változott számottevően az SqrF E163S mutáns enzim mennyiségének növelésének hatására (**43. ábra SqrF E163S**).

#### 4.2.4.2 Az SqrF E163A enzimvariáns katalitikus aktivitásának kinon koncentrációtól való függése

Az abiotikus kinon redukciónál kisebb sebességű enzimikus reakció megjelenésének analízise érdekében különböző reakciókörülmények között vizsgáltuk a jelenség előfordulását. Az enzimek összehasonlítására használt szulfid függő kinon redukáló aktivitás mérési körülmények között 50  $\mu\text{M}$  dUQ-t, 1  $\mu\text{g}$  SqrF E163A enzimet és 200  $\mu\text{M}$  szulfidot tartalmazott a reakcióelegyben (3.5.5 fejezet). Az enzimikus reakció sebessége nagyobb volt, mint az abiotikus kinon redukció. Az enzim mennyiségének növelésével azonban megfigyelhetővé vált az eltérő aktivitás, ugyanis a dUQ redukció sebesség jelentősen csökkent (kb. 70%-kal) az abiotikus reakcióhoz képest (44. ábra). Alacsonyabb dUQ koncentráció mellett volt a legnagyobb mértékű a csökkenés, amelyre az enzimmennyiség növelése nem volt hatással (44. ábra). A kinon koncentráció 100  $\mu\text{M}$ -ra növelésével az enzim aktivitása az abiotikus kinon redukció aktivitásával megegyezett. Megnövelt kinon koncentráció és enzimmennyiség mellett az SqrF E163A aktivitása kis mértékben csökkent az abiotikus reakció aktivitáshoz képest (44. ábra).

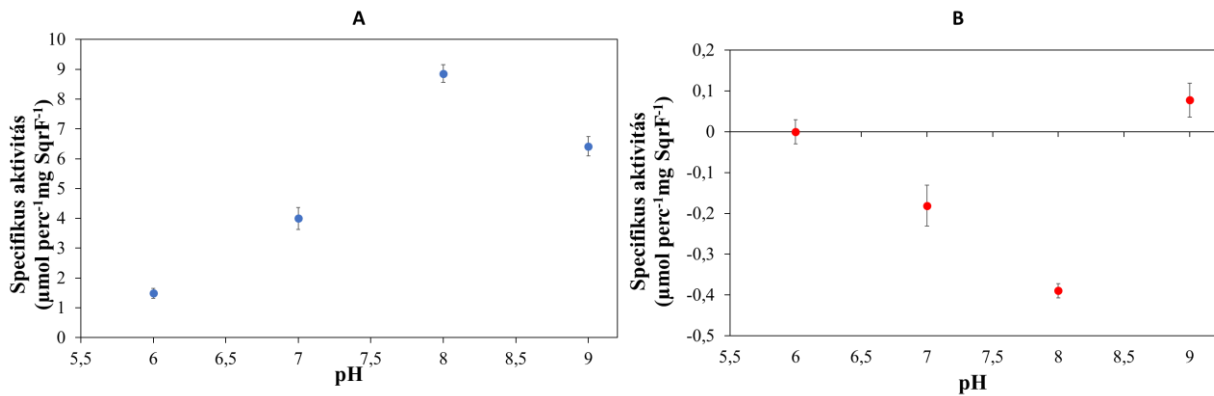


44. ábra: Az SqrF E163A enzimvariánsok aktivitásának dUQ koncentráció függése 1  $\mu\text{g}$  és 3  $\mu\text{g}$  enzimmennyiség alkalmazásával. A vonaldiagramokon a reakciók kinetikája került ábrázolásra. Az oszlopdiaagramokon a mért dUQ redukáló aktivitások láthatók. A zöld az abiotikus kinon redukciót, a piros az enzimmel kiegészített reakciókat jelöli

#### 4.2.4.3 Az SqrF E163A variáns katalitikus aktivitásának pH- függése

A Glu163 mutáns SqrF enzimeknek az abiotikus reakciónál kisebb sebességű dUQ redukciós aktivitásának további analízise érdekében a pH hatását vizsgáltuk. A vad típusú SqrF és az SqrF E163A variáns egyes pH értékeken mért aktivitásait úgy határoztuk meg, hogy a reakciók aktivitás értékeiből kivontuk az abiotikus reakciók aktivitás értékeit.

Korábbi eredmények alapján a vad típusú SqrF enzim legmagasabb aktivitása DQ és dUQ szubsztrátokkal a pH=8,00 értéken volt mérhető (csak a dUQ-val mért eredmények ábrázolva a **45. ábra A**-n) (Duzs és mtsai. 2018). A vad típusú enzim aktivitása alacsonyabb és magasabb pH-n is csökkent (**45. ábra A**). Az SqrF E163A pH=8,00 pufferben mutatja a legalacsonyabb aktivitást. Ennél alacsonyabb vagy magasabb pH tartományban nagyobb aktivitások voltak mérhetőek (**45. ábra B**). Az SqrF E163A pH függésének görbéje tükörképe a vad típusú SqrF pH függésének.



**45. ábra:** A vad típusú SqrF (A) és az SqrF E163A (B) enzimek aktivitásának pH függése. A kék szín jelöli a vad típusú SqrF fehérjét, a piros az SqrF E163A variánst

## 5. Diskusszió

### 5.1 A *T. roseopersicina* SqrF enzim kinon kötőhelyének azonosítása

Az SQR enzimekben a katalízis folyamata két részből áll. A redukív fázis során a szulfidról az elektronok az aktív centrumban lévő FAD-ra kerülnek a konzervált ciszteinek részvételével, majd a kofaktorról az elektronok a bioenergetikai membránokban lévő kinon raktárak molekuláira jutnak (**5. ábra**). A szulfid oxidációjának mechanizmusát, a szulfid-FAD elektrontranszfer folyamatot és a ciszteinek ebben játszott szerepét már több, az I., II., V. és VI. csoportba tartozó SQR enzim esetében vizsgálták (**6. ábra**, **7. ábra**, **15. ábra**). Azonban az oxidatív fázisról, a FAD-kinon elektrontranszfer katalízisról és a résztvevő aminosavakról kevés információ áll rendelkezésre. Ahhoz, hogy az SQR enzimben a szulfidról a kofaktorra kerülő elektronok a végső elektron akceptor kinonra jussanak, az enzimben a kinon molekulának az aktív centrumban található FAD redox csoportjához elegendően közel kell kerülnie, hogy közöttük közvetlenül vagy közvetetten, aminosavak részvételével megtörténhessen az elektronátadás. Ez egy C-terminális doménben elhelyezkedő csatornán keresztül tud megvalósulni. Ezt nevezzük kinon kötőhelynek, ami a fehérje felszínét összeköti az enzim aktív centrumában lévő kofaktor izoalloxazin gyűrűjével (**12. ábra**). A különböző SQR enzimek a fehérje szekvenciájában nagyfokú hasonlóságot mutatnak, bennük a kinon kötőhely szerkezete is nagyon hasonló. A csatornát felépítő három aminosav közül kettő a polipeptidben egymáshoz közel helyezkedik el, a harmadik pedig a C-terminális irányában távolabb, változó helyen (**17. ábra**). A különböző SQR enzimek kinon kötőhelyét különböző apoláris és aromás aminosavak építik fel, amelyek így egy apoláris fehérje felszínét hoznak létre.

Munkám elsődleges célja a *T. roseopersicina* SqrF enzim kinon kötőhelyének azonosítása, és a csatornát kialakító aminosavak katalízisben játszott szerepének vizsgálata volt. Mivel a *T. roseopersicina* SqrF enzimnek a szerkezete sem kinon kötő, sem a szubsztrátot nem kötő állapotban nincs meghatározva krisztallográfias módszerrel, így a fehérje kinon csatornáját kialakító aminosavakat dUQ-t kötő formában kristályosított SqrA fehérjék (Cherney és mtsai. 2010) szekvenciáival való összehasonlítás alapján azonosítottuk. Eszerint a *T. roseopersicina* SqrF kinon kötőhelyét a fehérje C-terminális régiójában elhelyezkedő Val331, Ile333 és a Phe366 aminosavak hozzák létre (**18. ábra**).

Az I. típusú SQR-ek között a legrészletesebben jellemzett az ismert kristályszerkezettel rendelkező *A. ferrooxidans* SqrA fehérje. Ennél a kinon fejet két aromás fenilalanin, valamint egy apoláris valin fogja közre szendvicsszerűen (**12. ábra A**) (Marcia és mtsai. 2009). Azonban az SQR-ek között gyakoribb, az *A. aeolicus* SqrA fehérjénél is megfigyelhető kinon kötőhely

szerkezet, amelyben a kinon kötő csatorna egyik falán izoleucin, a másikon fenilalanin található (**12. ábra B**) (Cherney és mtsai. 2012, 2010). Az SQR fehérjékben a *T. roseopersicina* SqrF Phe366 aminosavával homológ pozícióban leggyakrabban fenilalanin található, néhány esetben azonosítottak más aromás aminosavat (tirozint és triptofánt), vagy treonint (Cherney és mtsai. 2010; Marcia és mtsai. 2009). A *T. roseopersicina* SqrF fehérjében tehát a jellemzőbb apoláris aminosav-aromás aminosav elrendeződés figyelhető meg a kinonkötő csatornánál, ezért ez az enzim megfelelő modell lehet a többi SQR kinon kötőhely szerkezetének és funkciójának megismeréséhez.

Az SqrF enzim által megkötött dUQ és a fehérje közti kölcsönhatások felderítéséhez az enzim-dUQ komplex szerkezetének ismerete szükséges, amit *in silico* modellezéssel határoztunk meg. Mivel a dUQ feltehetően nem egyféle pozícióban helyezkedhet el a fehérjében, az SqrF-dUQ komplex többféle szerkezetű lehet, ezért egy molekuladinamika alapú módszert alkalmaztunk a lehetségesen kialakuló fehérje-szubsztrát szerkezetek modellezésére. Az eljárással szimulált szerkezetek feltehetően teljeskörűen reprezentálják a különböző lehetséges komplex szerkezeteket. Ez a megközelítés a komplex szerkezetének krisztallográfiás meghatározásához képest több információt adhat az enzim és a szubsztrát közti kapcsolatokról, mivel az utóbbi módszer segítségével a dUQ-nak a csak kristályokba beépült fehérje formákban való elhelyezkedése és kölcsönhatásai ismerhetők meg.

A modellezett SqrF-dUQ komplex szerkezetek analízise megerősítette, hogy a Val331, Ile333 és a Phe366 aminosavak alakítják ki a dUQ SqrF fehérjébe való belépését biztosító csatornát, mivel a modellezett komplex szerkezetek többségében a dUQ molekula ezekkel a csoportokkal lép kölcsönhatásba (**19. ábra, 20. ábra**).

A vad típusú *T. roseopersicina* SqrF homológia modellje alapján a Trp369 a fehérje felszínén, a kinon kötő csatorna bejáratának közelében helyezkedik el (**22. ábra**). Az *in silico* szimuláció alapján a Trp369 a dUQ decil oldalláncával lép kapcsolatba hidrofób kötésen keresztül (**20. ábra, 22. ábra**). Az *A. ferrooxidans* SqrA-ban levő Trp369-el homológ aminosav, a Tyr397 szintén a kinon kötőhely bejáratánál helyezkedik el és hidrofób kötést alakít ki a dUQ decil oldalláncával. Erről az aminosavról azt feltételezik, hogy a kinon feji csoport protonálásában is részt vesz (Zhang és mtsai. 2016; Cherney és mtsai. 2010;). Lehetséges, hogy a Trp369 csoport a *T. roseopersicina* SqrF enzimben is betölt ilyen funkciót. Azonban az SqrF enzim szerkezetének *in silico* modellezése vizes közegben, vízdobozban elhelyezett fehérjével történt. Lehetséges, hogy *in vivo* körülmények között a *T. roseopersicina* SqrF fehérjének a membránnal érintkező felszínén levő Trp369 a sejtmembránnal alakít ki kapcsolatot, nem pedig a dUQ decil láncával.

A modellek szerint a dUQ oxo csoportjai hidrogénkötéssel kapcsolódnak a Val331 vagy az Ile333 peptid-lánc amino-csoportjaihoz (**20. ábra**). A vad típusú *T. roseopersicina* SqrF *in silico* modellezése alapján a kinon egyféle orientációban helyezkedik el a fehérje kinon csatornájában, csak egy adott irányban állva képes a kötőhelyére belépni. Ezt alátámasztja az is, hogy a Val331 csak a dUQ feji régiójának O4 csoportjával, az Ile333 pedig csak az O1 csoporttal tud kötést kialakítani (**21. ábra**).

Az SqrF-dUQ szerkezeti modellek szerint az enzimben kötött dUQ benzokinon feji régiójának O2 oxocsoport atomja helyezkedik el legközelebb a FAD izoalloxazin gyűrűjéhez, annak O2 atomjához (**21. ábra**), hasonlóan a dUQ-nak az *A. ferrooxidans* SqrA fehérjében megfigyelhető elhelyezkedéséhez. Azonban a távolság a dUQ O4 atomja és az izoalloxazin csoport O2 atomja közt az SqrF fehérjében ( $5,3 \pm 0,3 \text{ \AA}$ ) (**21. ábra**) közel kétszer nagyobb, mint ami a kristályosított *A. ferrooxidans* SqrA fehérje szerkezetében mérhető a kofaktor és a szubsztrát ezen legközelebbi atomjai között ( $3 \text{ \AA}$ ). Ez a nagyobb távolság szintén lehetővé teszi még, hogy az SqrF fehérjében is közvetlenül valósuljon meg az elektron transzfer a kofaktor és a ligand között (Cherney és mtsai. 2010). Illetve a nagyobb távolságú elektron transzfer a molekulák közt magyarázatul szolgálhat arra, hogy a *T. roseopersicina* SqrF enzim kisebb specifikus aktivitású az SqrA enzimek aktivitásával összehasonlítva (Duzs és mtsai. 2018).

Annak érdekében, hogy vizsgáljuk az aminosav csere hatását az SqrF fehérje szerkezetére és a csatorna-dUQ komplex kapcsolatokra, a Phe366 aminosavat a kisebb helyigényű, egyszerűbb felépítésű alaninra cseréltük. Az SqrF F366A változatban a dUQ a fehérje sok olyan aminosavával is kialakított kölcsönhatást, amelyekkel a vad típusú SqrF-ben nem lépett kapcsolatba. Ellenben a Val331, Ile333 és Ala366 aminosavakkal a lehetséges szerkezetek kisebb részében hatott kölcsön a dUQ (**23. ábra**). A fenilalanin benzil oldalcsoportjának hiányában tehát nem tudott kialakulni a vad típusú SqrF fehérjében megfigyelhető kinon csatorna. Az SqrF F366A fehérje a mutáció következtében sokkal flexibilisebbé, lazább szerkezetűvé vált, aminek mélyebben elhelyezkedő részeibe is el tudott jutni a dUQ molekula (**25. ábra**). Ez rávilágított a dUQ és a Phe366 benzil csoportja közti kölcsönhatás fontosságára a normál kinon csatorna létrejöttében, illetve arra, hogy az enzimbe belépő dUQ hozzájárul a fehérje szerkezetének kialakításához, stabilizálásához a kinon kötőhely aminosavak és a dUQ közt létrejövő kémiai kötések révén.

Érdeemes megemlíteni, hogy a *T. roseopersicina* SqrF aminosav szekvenciája alapján a Val331 és Ile333 (a kinon redukciós folyamat résztvevői) között található a polipeptidben a konzervált Cys332 (a katalízis szulfid oxidációs lépésében játszik szerepet) (**17. ábra**). A C-terminális domén első  $\beta$ -lemezének egyik oldalán elhelyezkedő valin apoláris oldallánca a  $\beta$ -

lemez síkjához képest ellenkező irányba néz, mint a másik oldalon elhelyezkedő cisztein. Ez a szerkezeti elrendezés az enzimben végbemenő redox reakciósor két lépését választja el egymástól. Azonban a kinon csatornát felépítő valin és izoleucin megváltoztatása hatással lehet a köztük levő cisztein térbeli helyzetére, így a szulfid oxidáció folyamatára is.

## 5.2 A *T. roseopersicina* SqrF kinon kötőhely szerepe a katalitikus folyamatban

Az *in silico* módszerekkel azonosított kinon kötőhelyet kialakító aminosavak részvételét a *T. roseopersicina* SqrF redox reakciójának oxidatív lépésében pontmutáns fehérjék segítségével vizsgáltuk. Ezekben az aminosavakat alaninra és valamelyik más aromás aminosavra cseréltük. Közülük az SqrF I333A mutációt hordozó fehérjék nem voltak tisztíthatók. Ez arra utal, hogy az Ile333 aminosav ilyen megváltoztatásának nagyobb, a kinon kötőhely módosulásánál távolabb kifejtett hatása is van. Ennek következtében ezek az enzimváltozatok affinitás kromatográfiás oszloptöltetthez nem képesek kapcsolódni.

Korábbi eredmények alapján a VI. típusú SQR enzimek számára az ubikinon típusú kinonok (pl. DQ, dUQ) (**10.4 melléklet**) a legmegfelelőbb elektron akceptor szubsztrátok, mivel ezek alkalmazásával a legmagasabb az SqrF enzimek aktivitása (Duzs és mtsai. 2018). A DQ egy tetrametil-p-benzokinon hidrofób oldallánc nélkül, míg a dUQ redox csoportjának a gyűrűjéhez a metil csoport mellett két metoxi csoport kapcsolódik, valamint egy erősen apoláris decil-lánc (**10.4 melléklet**). A *T. roseopersicina* SqrF feltételezett természetes szubsztrátja az ubikinon-8 (UQ8), melyhez a dUQ felépítése hasonlít jobban (Duzs és mtsai. 2018). Az SqrF pontmutánsok aktivitásának DQ-val és dUQ-val való meghatározása rávilágított a dUQ apoláris hidrofób oldalláncának a szerepére is. A DQ egy benzokinon gyűrű molekula, ami valószínűleg a gyűrű bármelyik részével be tud lépni a kinon kötő csatornába. Ezek közt lehet olyan orientáció, amellyel nem, vagy kisebb valószínűséggel megy végbe a FAD-kinon elektrontranszfer az SQR enzimben. Ezzel szemben a dUQ felépítéséből adódóan a molekula egyik oldalával tud belépni a kinon kötő csatornába, így csak egyféle, az elektron transzfer számára kedvező orientációjú pozícióban foglalhat helyet a csatornában. Ennek is köszönhető, hogy az SqrF enzim szulfid függő kinon redukáló aktivitása dUQ-val magasabb, mint DQ-val.

Minden változás hatására csökkent az egyes SqrF enzimvariánsok aktivitása (**32. ábra**). Az affinitásuk vagy nem változott vagy nőtt a vad típusú SqrF-hez képest dUQ-val (**1. táblázat**). Ez az alaninra cserélt mutánsok esetén a kinon csatorna kiszélesedésének, az aromás aminosavakra történő cserével módosított enzimeknél a szubsztrát és a fehérje közti apoláros kölcsönhatások növekedésével magyarázható. Minden esetben csökkentik viszont a mutációk az enzim affinitását a DQ-hoz (nagyobb  $K_m$  érték) (**1. táblázat**). Ennek oka az lehet, hogy a

megváltozott geometriájú kinon csatornában a kis méretű kinon molekula még szabadabban, változatosabb pozíciókban helyezkedhet el.

A Val331 aminosav megváltoztatása (V331A, V331F) inaktív, vagy alacsony aktivitású enzimet eredményezett (**32. ábra**). A V331F mutáns aktivitása annak ellenére csökkent, hogy affinitása a dUQ szubsztráthoz nőtt (**1. táblázat**). Tehát az ilyen módon két aromás aminosav által kialakított csatornájú kinon kötőhely nem növeli meg az enzim aktivitását.

Az abszorpciós spektrum alapján az SqrF I333F mutánsban lehetséges, hogy nem tudott kialakulni a CTC komplex (**30. ábra**), amelyen keresztül végbe megy a szulfid és a FAD kofaktor közötti elektronátadás. Ez arra utal, hogy a mutációnak tehát nemcsak a *T. roseopersicina* SqrF katalízisének oxidatív fázisára van hatással, hanem feltehetően közvetetten a szulfid oxidációt is befolyásolja. Ez lehet az oka annak, hogy ennél a variánsnál volt mérhető a legalacsonyabb aktivitás (**32. ábra**). Az *A. ferrooxidans* SqrA Phe357 aminosav ugyanabban a pozícióban helyezkedik el, mint a *T. roseopersicina* SqrF Ile333. A Phe357 alaninra cserélésével a mutáns specifikus aktivitása a vad típusú enzim aktivitásának körülbelül 10%-a volt (Zhang és mtsai. 2016). Az I. típusú SQR-ek között nem a fenilalanin a gyakoribb a *T. roseopersicina* SqrF Ile333-nak megfelelő pozícióban, az *R. capsulatus* SqrA-ban leucin, az *A. aeolicus* SqrA esetén pedig izoleucin található ezen a helyen.

A Phe366 alanin és tirozin cseréje nagymértékű aktivitás csökkenést eredményezett, amellett, hogy az affinitás a dUQ-hoz itt nőtt a legnagyobb mértékben, a vad típusú és többi variáns SqrF-el összehasonlítva (**1. táblázat**). Az SqrF F366A variáns kinon kötő csatornájának mérete növekedett, az SqrF F366Y mutánsnál azonban méretbeli változás nem történt. Ennek az enzim változatnak a hatékonysága csak kis mértékben csökkent a vad típusúhoz képest (**1. táblázat**). Feltételezhetően a FAD és a kinon között az elektron-átadás valószínűsége kisebb a nem optimális elhelyezkedés következtében a fenilalanin mutáns SqrF-ek esetén. Az irodalomban elérhető adatok alapján a homológ aminosavnak más SQR fehérjében való cseréje is hasonló aktivitás csökkenést eredményezett. Az *A. ferrooxidans* SqrA enzimében levő megfelelő Phe394 aminosav alaninra cserélése, valamint a *C. maquilingsis* SqrC Phe362 alaninnal, tirozinnal vagy triptofánnal való helyettesítése szignifikáns csökkenést eredményezett az aktivitásban (Lencina és mtsai. 2020; Zhang és mtsai. 2016).

Mindezek mellett céljaink között szerepelt egy olyan fehérjének a létrehozása a megfelelő *T. roseopersicina* törzs segítségével, amelyből hiányzik a C-terminális  $\alpha$ -hélix (SqrF CTD). Az SqrF-ek között, így a *T. roseopersicina* fehérjében is csak egy  $\alpha$ -hélix található a C-terminális régióban és az is rövidebb, mint a többi SQR enzimé (Marcia és mtsai. 2010a).



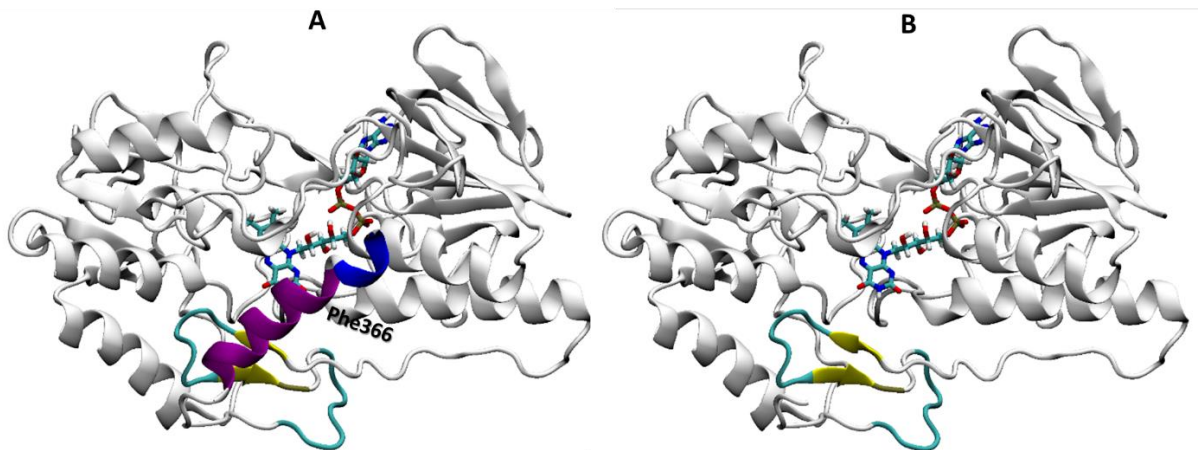
Az SqrF CTD mutáns, a vad típusú és a többi SqrF variánshoz képest nagyobb arányban tartalmazott olyan fehérjéket, amelyekben redukált volt a FAD (**30. ábra**, **31. ábra**), azonban a redox aktív kofaktor képes volt katalizálni a szulfid függő kinon redukciót (**32. ábra**). Továbbá ez a variáns a többihez hasonlóan a membránhoz kötött állapotban volt jelen a sejtekben (**28. ábra**). Azonban jelentősen nagyobb mennyiségben (6,5-ször több, mint a vad típusú SqrF) sikerült tisztítani az SqrF CTD mutánst a vad típusúhoz képest. Ez arra utal, hogy a C-terminális  $\alpha$ -hélix hiányában könnyebben szolubilizálható a fehérje. Tehát ez a hélix kapcsolatban van a membránnal, de kevesebb kölcsönhatással, gyengébben kötődik hozzá. Tehát a *T. roseopersicina* SqrF C-terminális  $\alpha$ -hélix részt vesz a membránhoz horgonyzódásban, de nem esszenciális ehhez. Korábbi feltételezések alapján az SQR fehérjék C-terminális domén  $\alpha$ -héliceinek egyik szerepe a membránhoz való kihorgonyzás (Cherney és mtsai. 2010). Azoknál az SQR enzimeknél, ahol két  $\alpha$ -hélix található, például *C. maquilensis* SqrC-nél kísérletesen vizsgálták, hogy az egyik vagy mindkettő C-terminális  $\alpha$ -hélixének eltávolításával szolubilissé és inaktívvá válik a fehérje, tehát nélkülözhetetlen a membránhoz horgonyzódásban (Lencina és mtsai. 2020, 2013), valamint az oligomerizációban is szerepe lehet (Cherney és mtsai. 2010).

A Phe366 mutációi nagyobb aktivitás csökkenést eredményeztek, mint a C-terminális  $\alpha$ -hélix eltávolítása (**32. ábra**). Ez az aminosav, ugyanúgy, mint a Trp369 ezen a C-terminális  $\alpha$ -hélixen helyezkedik el a *T. roseopersicina* SqrF enzimben (**26. ábra**). A deléciós mutáns enzim affinitása a dUQ molekulához és a hatékonysága hasonló volt (**1. táblázat**), aktivitása azonban közel a fele volt, mint a vad típusú SqrF enzimnek (**32. ábra**). A C-terminális  $\alpha$ -hélix eltávolításával a dUQ könnyebben tudhat hozzákötődni az SqrF fehérjéhez, mert szélesebbé válik a kinon csatorna (**46. ábra B**), így a kinon könnyebben a FAD izoalloxazin gyűrűjének közelébe kerül az aktív centrumban. Azonban fontos elemek hiányoznak az SqrF CTD variáns fehérjéből a szubsztrátnak az elektronátadáshoz megfelelő optimális helyzetben való megkötéséhez. Az egyik fontos elem a C-terminális doménen elhelyezkedő Phe366 aminosav, ami a kinon kötésében vesz részt, valamint az egész  $\alpha$ -hélix. Jelentős mértékben gyengül az enzim-ligand komplex stabilitása, így az elektrontranszfer kisebb valószínűséggel következik be. A mutáció hatásai összességében a terminális  $\alpha$ -hélix deléciós mutáns SqrF enzim kisebb katalitikus aktivitását eredményezik.

Az SqrF CTD variáns alacsony hőmérsékleten (30 °C) mutatott maximális aktivitása a FAD-kinon közötti alacsonyabb stabilitású kapcsolatra utal (**33. ábra**). Ennek a variánsnak a legmagasabb az aktivációs energiája összehasonlítva a vad típusú és pontmutáns SqrF enzimekkel (**1.táblázat**). Tehát az elektrontranszfer számára a FAD és a kinon ebben a

fehérjében van a legkedvezőtlenebb helyzetben, itt a legmagasabb az elektrontranszfer reakció során átlépendő energiáját. Ugyanakkor a nem optimális térbeli szerkezetben kötött kinonnal is végbe tud menni az elektrontranszfer.

Az SqrF CTD mutáns a hőmérséklet növelésével nem veszített a stabilitásából (**34. ábra**). Tehát a katalitikus képesség nagyfokú hőérzékenysége nem a fehérjeszerkezet alacsony hőstabilitása az oka. A fehérje C-terminálisán levő  $\alpha$ -hélix hiánya nem okozza a fehérjeszerkezet stabilitásának csökkenését. Azonban a hőmérséklet növelésével a C-terminális régió flexibilitása nő, így többféle orientációban tud beépülni a dUQ. Ez rontja az elektronátadás valószínűségét, ellenben a vad típusú SqrF esetén a C-terminális régió flexibilitása kisebb mértékű (**46. ábra**). Irodalmi adatok a C-terminális  $\alpha$ -hélix eltávolításával tisztított SQR fehérjék részletes jellemzéséről nem állnak rendelkezésre, mert csak inaktív fehérjét sikerült eddig izolálni.



**46. ábra:** A vad típusú (A) és a CTD mutáns (B) *T. roseopersicina* SqrF enzim szerkezeti modellje (C-terminális  $\alpha$ -hélix: lila, feketével kiemelve a vad típusú SqrF fehérjén elhelyezkedő Phe366).

Az eredmények alapján összegzőképpen levonható az a következtetés, hogy a *T. roseopersicina* VI. típusú SQR katalízisének oxidatív lépésében, a Val331, Ile333 és Phe366 aminosavak játszanak szerepet, még hozzá a hidrofób kinon kötő csatorna kialakításával (**26. ábra**). Ezek az aminosavak hidrofób és hidrogénkötésekkel optimális pozícióban tartják a szubsztrát benzokinon gyűrűjét a FAD-kinon elektronátadáshoz. A dUQ kölcsönhatásai a kinon csatorna két oldalát alkotó aminosavakkal a fehérjeszerkezet stabilitásához is hozzájárulnak.

Ezen felül az Ile333 megváltozása hatással van a katalízis szulfid oxidációs lépésére, a szulfid és FAD közötti elektronátadásra is. Ez feltehetően az SqrF fehérjének ezen a pontján kialakított mutáció közvetett hatása. Továbbá a Trp369 a kinon hidrofób odallancának megkötésében vesz részt a membránhoz nem kapcsolódó állapotban levő, vizes közegben

elhelyezkedő fehérjékben. Lehetséges, hogy ez a csoport *in vivo* körülmények között nem köti a dUQ decil oldalláncot, mivel a fehérjének a membránnal érintkező felszínén helyezkedik el az SqrF enzimben.

A *T. roseopersicina* SqrF C-terminális egyetlen  $\alpha$ -hélixének hiánya ellenére a fehérje képes a membránhoz kötődni. Valamint, ezen régió nélkül a szubsztrát egy szélesebb csatornába tud belépni, azonban nem megfelelő orientációban is kötődhet. A kiszélesedett csatornába belépő kinon és a FAD között meg tud valósulni az elektrontranszfer, de kisebb valószínűséggel. Tehát a C-terminális  $\alpha$ -hélixnek szerepe van a megfelelő pozíciójú kinon kötésében, valamint a stabil, optimális szerkezetű enzim-kinon kapcsolat létrejöttében az ennek a létrejöttét biztosítani tudó megfelelő felépítésű kinon csatorna kialakításában való részvétellel.

### 5.3 A Glu163 konzervált aminosav szerepének vizsgálata *T. roseopersicina* SqrF enzimben

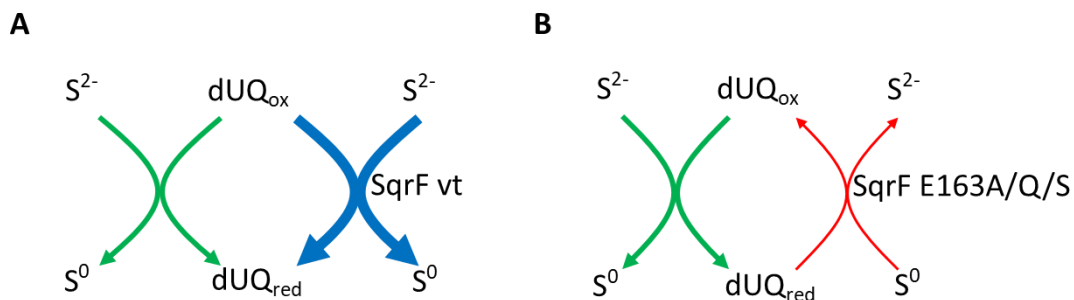
Az SQR enzimek aktív centrumában a konzervált ciszteineken kívül más nagyfokú konzerváltságot mutató aminosav is megtalálható, melyeknek szerepe lehet a katalitikus működésben. A *T. roseopersicina* SqrF enzimben az egyik ilyen aminosav a Glu163, ami a FAD kofaktor közelében helyezkedik el (35. ábra). Ez a csoport minden SQR enzimben megtalálható, kivéve a II. típusú, eukarióta sejtekben jelen levő SQR fehérjét, amelyekben lizin foglal helyet ebben a pozícióban (8. ábra). Az SQR enzimek aktív centrumában levő savas aminosavak szerepéről csak feltételezések találhatók az irodalomban, és ezeket kísérletes módszerekkel még nem igazolták. Egy működési modell szerint a Glu163 *R. capsulatus* SqrA enzimben megtalálható homológja a szulfid-FAD közti redox reakció katalízisében az elektrontranszfert kísérő protonátadással vesz részt (9. ábra) (Sousa és mtsai. 2018). Az *A. ambivalens* SqrE enzim két aktív centrum közeli aszparaginsav csoportjáról ugyanakkor azt feltételezik, hogy az enzimbe belépő szulfidot hidrogénkötésekkel kötik, így biztosítva a szubsztrát megfelelő pozícióját az aktív centrumban a katalitikus szerepű aminosavakkal történő reakcióhoz (Brito és mtsai. 2009).

A *T. roseopersicina* SqrF Glu163 szerepének vizsgálata érdekében létrehozott különböző pontmutáns SqrF variánsok mindegyike kovalensen köti a FAD-ot, ami alapján a glutaminsavnak nincs szerepe a kofaktor kötésében. Az SqrF E163Q abszorpciós spektrumában alacsonyabbak a redukált redox állapotú FAD kofaktor fényelnyelési maximumainál található csúcsok (40. ábra). Ez alapján ennek a mutációnak a következtében vagy olyan módon változik a fehérje szerkezete, hogy a FAD kevésbé képes az SqrF-be való beépülésre, vagy nagyobb arányban vannak redukált FAD-ot tartalmazó enzimek a tisztítással előállított mintákban.

Annak ellenére, hogy az SqrF E163D variáns hasonlít a legnagyobb mértékben a vad típusú SqrF enzimekre, ebből a mutánsból csak nagyon kis mennyiséget lehetett előállítani (**38. ábra**, **39. ábra**). Ennek oka az lehet, hogy a fehérje olyan konformációt vehet fel, amiben az N-terminális StrepII peptid fedésben van és így nem kötődik hatékonyan az affinitás kromatográfiához használt oszloptöltetkez. Az SqrF E163D mutáns esetében nagyobb a redukált FAD kofaktort tartalmazó enzimek aránya, mint a többi tisztított mintában (**40. ábra**). Ez arra utalhat, hogy az ezeket expresszáló *T. roseopersicina* sejtekben redukálódott enzimek nem, vagy nehezebben tudnak oxidált állapotba kerülni, vagyis ennek a mutációnak hatása van az elektronoknak FAD-ról a kinonokra való továbbadására.

A Glu163 szerepét a szulfid oxidáció folyamatában az SqrF E163A mutáns vizsgáltuk, mivel ezt a variánst sikerült a legnagyobb mennyiségben tisztítani. Az SqrF E163A mutáns nátrium-ditionittal redukálható volt, azonban a szulfid jelenlétében nem változott meg a fehérje, és így a kofaktor redox állapota (**41. ábra**). Tehát a 163. glutaminsavnak esszenciális szerepe van az SqrF enzim működésének szulfid oxidációs lépésében, mivel hiányában a szulfid-FAD elektronátadás nem valósul meg. Ez megfelel a homológ *R. capsulatus* SqrA enzim működésében feltételezett szerepének, mivel a protontranszfer hiányában a szulfid és a FAD közti elektron transzfer itt sem tud végbemenni (Griesbeck és mtsai. 2002).

Az SqrF E163A, E163Q és E163S enzimvariánsok aktivitása DQ-val nem volt mérhető (**42. ábra**), dUQ-val azonban más SQR enzimeknél és azok mutánsainál még nem tapasztalt jelenség volt megfigyelhető. A Glu163 különböző pontmutáns SqrF enzimvariánsok jelenlétében az abiotikus reakciónál kisebb sebességű dUQ redukció játszódott le (**43. ábra**). A megfigyelt jelenségnek magyarázata lehet, hogy a Glu163 mutáns enzimeket tartalmazó reakcióelegyekben redukált kinon függő szulfid oxidáció következik be. Feltehetően a redukálódott kinonok lassabb sebességű keletkezését az okozhatja, hogy az enzimtől függetlenül végbemenő szulfid és dUQ közti elektron-átadásban redukálódó kinon molekulák újra oxidálódnak az SqrF Glu163 aminosav mutánsainak jelenlétében (**47. ábra**).



**47. ábra:** A szulfid függő dUQ redukció sematikus ábrája vad típusú SqrF enzim (A) és Glu163 SqrF variáns jelenlétében (B). A zöld szín jelöli az abiotikus reakciót, a kék a vad típusú SqrF enzim által katalizált reakciót és a piros a Glu163 SqrF enzimvariánsok által katalizált reakciót

Az enzimmennyiség növelésével csökkent a katalízis sebessége (**43. ábra**), azonban a dUQ koncentrációjának növelésének nem volt rá hatása. A kinon koncentráció csökkenésével viszont a reakció sebessége csökkent (**44. ábra**). Tehát kisebb koncentrációjú kinon vagy nagyobb mennyiségű enzim jelenlétében csökken a dUQ redukálódásának a sebessége. Lehetséges, hogy a kevés kinon esetén gyorsabban lejátsszódik az abiotikus reakció a reakcióelegyben, mint hogy ott fehérjével találkozzon a kinon.

Az SqrF E163A mutáns aktivitásának ugyanúgy pH=8,00 értéken van a maximuma, mint a vad típusú SqrF enzim normál SQR aktivitásának (**45. ábra**). Tehát a mutánsok által feltehetően katalizált kinon oxidációra hasonló hatással van a pH, mint a vad típusú SqrF aktivitására.

Összegezve az eredményeket levonható az a következtetés, hogy a konzervált 163. pozíciójú glutaminsavnak a *T. roseopersicina* SqrF enzimben szerepe van a katalitikus működésben. Részt vesz a szulfid oxidációs lépésben, mivel a szulfid-FAD elektrontranszfer folyamata nem megy végbe protontranszfer nélkül.

## 6. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom mindenkinek, akik bármilyen módon közreműködtek a munka elkészülésében.

Mindenekelőtt mérhetetlen hálával tartozom témavezetőimnek: Dr. Rákhely Gábornak és Dr. Tóth Andrásnak, hogy az életem meghatározó szakaszát, biológussá válásom folyamatát velük karöltve, a szakmai irányításuk alatt vihettem végig. Köszönöm az éveken át tartó türelmüket, iránymutatásukat és önzetlen segítségüket.

Köszönöm Dr. Duzs Ágnesnek, hogy a labormunka fortélyait megtanította. A barátságát, és a „pótanya” szerepét, mellyel végig tartotta bennem a lelket. Nem utolsó sorban, de véglegesen egy örök barátságot köszönhetek neki. Köszönöm Dr. Paragi Gábornak a segítségét a bioinformatikai analízisek során a munka elkészülésében. Köszönettel tartozom Prof. Dr. Kovács Kornélnak, aki támogatásával hozzájárult a munka elkészüléséhez. Szeretném megköszönni volt irodatársaimnak: Dr. Tóth Liliánának, Papp Saroltának és Dr. Bodor Attilának, hogy a hirtelenségem, önfejűségem és harsány lényem ellenére támogattak, bíztattak és segítettek az évek során.

Köszönöm a jelenlegi irodatársaimnak: Dr. Bálint Balázsnak, Dr. Hegedüs Botondnak és Dr. Merényi Zsoltnak, hogy elviselték az utolsó időszakot, amikor csak panaszkodtam éjt nappallá téve, miközben abban reménykedtek, hogy nagyon sok dolgom van a laborban. Köszönöm Dr. Nagy G. Lászlónak, hogy megelőlegzve a szakmaiságom esélyt adott egy teljesen új és izgalmas terület megismerésére a Lendület Gomba Genomika és Evolúció Csoport tagjaként. Köszönöm Dr. Virágh Máténak, hogy támogatott és segített a munkám során. Valamint Dr. Csernetics Árpádnak, hogy nem vállalta a dolgozatom bírálatát, továbbá, hogy naponta motivált azzal, hogy szerinte úgysem lesz PhD-m, de azért támogatott, ha látta, hogy török a mécses.

Köszönettel tartozom az SZTE TTIK Biotechnológiai Tanszék és az SZBK Biofizikai Intézet minden dolgozójának a munkám sikeréhez való hozzájárulásukért. Köszönöm a Lendület Gomba Genomika és Evolúció Csoport összes munkatársának a támogatást a PhD éveim utolsó időszakában.

Köszönöm Dr. Nagy Lászlónak, hogy elvállalta az opponens szerepét mind a házi védésen, mind a nagy védésen, a szakmai tanácsait és munkáját. Köszönöm Dr. Galgóczi László Norbertnek a számos szakmai és kevésbé szakmai beszélgetést, a támogatást és a házi védésem bírálatát.

Mérhetetlen hálával tartozom Családomnak, Édesanyámnak és Édesapámnak a végtelen támogatásért és segítségért az életem és a PhD éveim során. Nagyon köszönöm páromnak, Geleta Dávidnak, hogy a legnehezebb időszakban is mellettem volt és a végtelen türelmét. Köszönettel tartozom Barátaimnak, hogy a küzdelmes időszak ellenére is a Barátaim maradtak és támogattak.

## 7. Irodalomjegyzék

- Altschul, SF., Gish, W., Miller, W., Myers EW., és Lipman DJ. 1990. „Basic local alignment search tool”. *Journal of Molecular Biology* 215(3):403–10. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
- Borsodi, A., Felföldi, T., Jáger, K., Makk, J., Márialigeti, K., Romsics, Cs., Tóth, E., Bánfi, R., Pohner, ZS., Vajna, B. 2013. „Bevezetés a prokarióták világába”. könyv
- Argyrou, A., Vetting, MW., és Blanchard JS. 2004. „Characterization of a new member of the flavoprotein disulfide reductase family of enzymes from *Mycobacterium tuberculosis*”. *Journal of Biological Chemistry* 279(50):52694–702. doi: 10.1074/jbc.M410704200.
- Arieli, B., Binder B., Shahak, Y., és Padanl, E. 1989. „Sulfide induction of synthesis of a periplasmic protein in the cyanobacterium *Oscillatoria limnetica*”. *Journal of Bacteriology*. 171(2):699-702. doi: 10.1128/jb.171.2.699-702.1989.
- Arieli, B., Shahak, Y., Taglicht, D., Hauska, G., és Padan, E. 1994. „Purification and characterization of sulfide-quinone reductase, a novel enzyme driving anoxygenic photosynthesis in *Oscillatoria limnetica*”. *Journal of Biological Chemistry* 269(8):5705–11. doi: 10.1016/S0021-9258(17)37518-X.
- Ausubel, FM., Brent, R., R., Kingston, RE., Moore, DD., Seidman, JG., Smith, JA., Struhl, K., Goldstein, M., Watkins, S., és Smith, C. 1994. „Current protocols in molecular biology”. ISBN: 047150338X.
- Barton, LL., Fardeau, M-L., és Fauque, ÉD. 2014. „Hydrogen sulfide: A toxic gas produced by dissimilatory sulfate and sulfur reduction and consumed by microbial oxidation”. *Metal Ions in Life Sciences*. doi: 10.1007/978-94-017-9269-1\_10.
- Blum, O., Haiek, A., Cwikel, D., Dori, Z., Meade, TJ., és Gray. HB. 1998. „Isolation of a myoglobin molten globule by selective cobalt(III)-induced unfolding”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95(12):6659–62. doi: 10.1073/pnas.95.12.6659.
- Bowers, KJ., Chow, DE., Xu, H., Dror, RO., Eastwood, MP., Gregersen, BA., Klepeis, JL., Kolossvary, I., Moraes, MA., Sacerdoti, FD., Salmon, JK., Shan, Y., és Shaw, DE. 2006. „Scalable algorithms for molecular dynamics simulations on commodity clusters”. *ACM/IEEE SC 2006 Conference (SC'06)*. book e-ISBN: 0-7695-2700-0. doi: 10.1109/SC.2006.54

- Brito, JA., Sousa, FL., Stelter, M., Bandejas, TM., Vorrhein, C., Teixeira, M., Pereira, MM., és Archer, M. 2009. „Structural and functional insights into sulfide:quinone oxidoreductase”. *Biochemistry* 48(24):5613–22. doi: 10.1021/bi9003827.
- Bronstein, M., Schütz, M., Hauska, G., Padan, E., és Shahak, Y. 2000. „Cyanobacterial sulfide-quinone reductase: Cloning and heterologous expression”. *Journal of Bacteriology*. 182(12):3336-44. doi: 10.1128/JB.182.12.3336-3344.2000.
- Brune, DC. 1995. „Sulfur compounds as photosynthetic electron donors”. *Anoxygenic photosynthetic bacteria*. Kluwer Academic Publishers. doi: 10.1007/0-306-47954-0-39.
- Brune, DC., és Trüper, HG. 1986. „Noncyclic electron transport in chromatophores from photolithotrophically grown *Rhodobacter sulfidophilus*”. *Archives of Microbiology* 145:295-301.
- Cavanaugh, CM. 1983. „Symbiotic chemoautotrophic bacteria in marine invertebrates from sulphide-rich habitats”. *Nature*. 302:58-61. doi: 10.1038/302058a0.
- Chan, L-K., Morgan-Kiss, RM., és Hanson, TE. 2009. „Functional analysis of three sulfide:quinone oxidoreductase homologs in *Chlorobaculum tepidum*”. *Journal of Bacteriology* 191(3):1026–34. doi: 10.1128/JB.01154-08.
- Chen, ZW., Koh, M., Van Driessche, G., Van Beeumen, JJ., Bartsch, RG., Meyer, TE., Cusanovich, MA., és Mathews, FS. 1994. „The structure of flavocytochrome c sulfide dehydrogenase from a purple phototrophic bacterium.” *Science (New York, N.Y.)* 266(5184):430–32. doi: 10.1126/science.7939681.
- Cherney, MM., Zhang, Y., James, MNG., és Weiner, JH. 2012. „Structure-activity characterization of sulfide:quinone oxidoreductase variants”. *Journal of Structural Biology* 178(3):319–28. doi: 10.1016/j.jsb.2012.04.007.
- Cherney, MM., Zhang, Y., Solomonson, M., Weiner, JH., és James, MNG. 2010. „Crystal structure of sulfide:quinone oxidoreductase from *Acidithiobacillus ferrooxidans*: Insights into sulfidotrophic respiration and detoxification”. *Journal of Molecular Biology* 398(2):292–305. doi: 10.1016/j.jmb.2010.03.018.
- Cron, B., Henri, P., Chan, CS., Macalady, JL., és Cosmidis, J. 2019. „Elemental sulfur formation by *Sulfuricurvum kujiense* is mediated by extracellular organic compounds”. *Frontiers in Microbiology* doi: 10.3389/fmicb.2019.02710.
- Dawson, RMC. 1989. *Data for biochemical research*. Oxford: Clarendon Press Publisher. ISBN: 0198552998.



- Degli EM., Lenaz, G., Izzo, G., és Papa, S. 1982. „Kinetics and sidedness of ubiquinol-cytochrome c reductase in beef-heart mitochondria”. *FEBS Letters* 146(1):101–5. doi: 10.1016/0014-5793(82)80713-8.
- Ding, H., Moksa, MM., Hirst, M., és Beatty, JT. 2014. „Draft genome sequences of six *Rhodobacter capsulatus* strains, YW1, YW2, B6, Y262, R121, and DE442”. *Genome Announcements* 2(1). doi: 10.1128/genomea.00050-14.
- Dorf, R., és Bishop, R. 2011. „Modern Control Systems”. 11. kiadás New Jersey, USA: Prentice Hall. ISBN: 0131383108.
- Duzs, Á., Miklovics N., Paragi, G., Rákhely, G., és Tóth, A. 2021. „Insights into the catalytic mechanism of type VI sulfide:quinone oxidoreductases”. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1862(2). doi: 10.1016/j.bbabi.2020.148337.
- Duzs, Á., Tóth, A., Németh, B., Balogh, T., Kós, PB., és Rákhely, G. 2018. „A novel enzyme of type VI sulfide:quinone oxidoreductases in purple sulfur photosynthetic bacteria”. *Applied Microbiology and Biotechnology* 102(12):5133–47. doi: 10.1007/s00253-018-8973-x.
- Faou, A., Rajagopal, BS., Daniels, L., és Fauque, G. 1990. „Thiosulfate, polythionates and elemental sulfur assimilation and reduction in the bacterial world”. *FEMS Microbiology Letters* 75(4):351–81. doi: 10.1111/j.1574-6968.1990.tb04107.x.
- Fodor, B., Rákhely, G., Kovács ÁT., Kovács KL., G. 2001. „Transposon mutagenesis in purple sulfur photosynthetic bacteria: Identification of HypF, encoding a protein capable of processing [NiFe] hydrogenases in  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$  subdivisions of the Proteobacteria”. *Applied and Environmental Microbiology* 67(6):2476–83. doi: 10.1128/AEM.67.6.2476-2483.2001.
- Friedrich, CG., Rother, D., Bardischewsky, F., Quentmeier, A., és Fischer, J. 2001. „Oxidation of reduced inorganic sulfur compounds by bacteria: Emergence of a common mechanism?” *Applied and environmental microbiology* 67(7):2873–82. doi: 10.1128/AEM.67.7.2873-2882.2001.
- Friedrich, CG., Bardischewsky, F., Rother, D., Quentmeier, A., és Fischer, J. 2005. „Prokaryotic sulfur oxidation”. *Current Opinion in Microbiology* 8(3):253–9. doi: 10.1016/j.mib.2005.04.005.
- Ghosh, W., és Dam, B. 2009. „Biochemistry and molecular biology of lithotrophic sulfur oxidation by taxonomically and ecologically diverse bacteria and archaea”. *FEMS Microbiology Reviews* 33(6):999–1043. doi: 10.1111/j.1574-6976.2009.00187.x.

- Gogotov, IN., Zorin, NA., Serebriakova, LT., és Kondratieva, EN. 1978. „The properties of hydrogenase from *Thiocapsa roseopersicina*”. *Biochimica et Biophysica Acta*. 523(2):335–43. doi: 10.1016/0005-2744(78)90036-0.
- Gregersen, LH., Bryant, DA., és Frigaard, NU. 2011. „Mechanisms and evolution of oxidative sulfur metabolism in green sulfur bacteria”. *Frontiers in Microbiology* 2(116):1–14. doi: 10.3389/fmicb.2011.00116.
- Griesbeck, C., Hauska, G., és Schütz, M. 2000. „Biological sulfide oxidation: Sulfide-quinone reductase (SQR), the primary reaction”. *Recent research developments in microbiology* 4:179–203.
- Griesbeck, C., Schütz, M., Schödl, T., Bathe, S., Nausch, L., Mederer, N., Vielreicher, M., és Hauska, G. 2002. „Mechanism of sulfide-quinone reductase investigated using site-directed mutagenesis and sulfur analysis”. *Biochemistry* 41(39):11552–65. doi: 10.1021/bi026032b.
- Hammerstad, M., és Hersleth, HP. 2021. „Overview of structurally homologous flavoprotein oxidoreductases containing the low Mr thioredoxin reductase-like fold – A functionally diverse group”. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 702. doi: 10.1016/j.abb.2021.108826.
- Hanukoglu, I. 2015. „Proteopedia: Rossmann fold: A beta-alpha-beta fold at dinucleotide binding sites”. *Biochemistry and Molecular Biology Education* 43(3):206–9. doi: 10.1002/bmb.20849.
- Hildebrandt, TM., és Grieshaber, MK. 2008. „Three enzymatic activities catalyze the oxidation of sulfide to thiosulfate in mammalian and invertebrate mitochondria”. *FEBS Journal* 275(13):3352–61. doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06482.x.
- Hirano, Y., Kimura, Y., Suzuki, H., Miki, K., és Wang, ZY. 2012. „Structure analysis and comparative characterization of the cytochrome c and flavocytochrome c from thermophilic purple photosynthetic bacterium *Thermochromatium tepidum*”. *Biochemistry* 51(33):6556–67. doi: 10.1021/bi3005522.
- Hugenholtz, P., Pitulle, C., Hershberger, KL. és Pace, NR. 1998. „Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring”. *Journal of Bacteriology* 180(2):366–76. doi: 10.1128/JB.180.2.366-376.1998.
- Inoue, H., Nojima, H., és Okayama, H. 1990. „High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids”. *Gene* 96(1):23–28. doi: 10.1016/0378-1119(90)90336-P.

- Jackson, MR., Loll, PJ., és Jorns, MS. 2019. „X-Ray structure of human sulfide:quinone oxidoreductase: Insights into the mechanism of mitochondrial hydrogen sulfide oxidation”. *Structure* 27(5):794-805.e4. doi: 10.1016/j.str.2019.03.002.
- Jackson, MR., Melideo, SL., és Jorns, MS. 2012. „Human sulfide:quinone oxidoreductase catalyzes the first step in hydrogen sulfide metabolism and produces a sulfane sulfur metabolite.” *Biochemistry* 51(34):6804–15. doi: 10.1021/bi300778t.
- Jackson, MR., Melideo, SL., és Jorns, MS. 2015. „Role of human sulfide:quinone oxidoreductase in H<sub>2</sub>S metabolism”. *Methods in Enzymology*. 554:255-70. doi: 10.1016/bs.mie.2014.11.037.
- Jacobson, MP., Friesner, RA., Xiang, Z., és Honig, B. 2002. „On the role of the crystal environment in determining protein side-chain conformations”. *Journal of Molecular Biology* 320(3):597–608. doi: 10.1016/S0022-2836(02)00470-9.
- Jacobson, MP., Pincus, DL., Rapp, CS., Day, T.J.F., Honig, B., Shaw, DE., és Friesner, RA. 2004. „A hierarchical approach to all-atom protein loop prediction”. *Proteins: Structure, Function and Genetics* 55(2):351–67. doi: 10.1002/prot.10613.
- Jorgensen, W.L., Maxwell, D.S., és Tirado-Rives, J. 1996. „Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids”. doi: J. Am. Chem. Soc.118(45):11225-11236, doi:10.1021/ja9621760.
- Kimura, H., 2002. „Hydrogen sulfide as a neuromodulator”. *Molecular Neurobiology* 26(1):13–19. doi: 10.1385/MN:26:1:013.
- Kondratieva, EN., Zhukov, VG., Ivanovsky, RN., Petushkova, YP., és Monosov, EZ. 1976. „The Capacity of Phototrophic Sulfur Bacterium *Thiocapsa roseopersicina* for Chemosynthesis”. *Köt. Archives of Microbiology* 108(3):287-92. doi: 10.1007/BF00454854.
- Kostanjevecki, V., Brigé, A., Meyer, TE., Cusanovich, MA., Guisez, Y., és Van Beeumen, J. 2000. „A Membrane-Bound Flavocytochrome c-Sulfide Dehydrogenase from the Purple Phototrophic Sulfur Bacterium *Ectothiorhodospira vacuolata*”. *Journal of Bacteriology* 182(11): 3097-103. doi: 10.1128/JB.182.11.3097-3103.2000.
- Kovacs, Á.T., Rákhely, G., és Kovács KL. 2003. „Genes Involved in the biosynthesis of photosynthetic pigments in the purple sulfur photosynthetic bacterium *Thiocapsa roseopersicina*”. *Applied and Environmental Microbiology* 69(6):3093–3102. doi: 10.1128/AEM.69.6.3093-3102.2003.

- Kröger, A. 1978. „Determination of contents and redox states of ubiquinone and menaquinone”. *Methods in Enzymology* 53(C):579–91. doi: 10.1016/S0076-6879(78)53059-0.
- Lencina, AM., Ding, Z., Schurig-Briccio, LA. és Gennis, RB. 2013. „Characterization of the type III sulfide:quinone oxidoreductase from *Caldivirga maquilingensis* and its membrane binding”. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1827(3):266–75. doi: 10.1016/j.bbabi.2012.10.010.
- Lencina, AM., Gennis, RB. és Schurig-Briccio, LA. 2020. „The oligomeric state of the *Caldivirga maquilingensis* type III sulfide:quinone oxidoreductase is required for membrane binding”. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1861(2). doi: 10.1016/j.bbabi.2019.148132.
- Lloyd, D. 2006. „Hydrogen sulfide: Clandestine microbial messenger?” *Trends in microbiology* 14(10):456–62. doi: 10.1016/j.tim.2006.08.003.
- Lu, X., Zhao, L., Tong, Y., Yang, H., és Feng, S. 2023. „Insights into the catalytic mechanism of a type I sulfide quinone oxidoreductase (SQR) from *Acidithiobacillus caldus*”. *Systems Microbiology and Biomanufacturing*. doi: 10.1007/s43393-023-00165-4.
- Luo, J., Tian, G., és Lin, W. 2013. „Enrichment, isolation and identification of sulfur-oxidizing bacteria from sulfide removing bioreactor”. *Journal of Environmental Sciences (China)* 25(7):1393–99. doi: 10.1016/S1001-0742(12)60179-X.
- Lü, C., Xia, Y., Liu, D., Zhao, R., Gao, R., Liu, H., és Xun, L. 2017. „*Cupriavidus necator* H16 uses flavocytochrome c sulfide dehydrogenase to oxidize self-produced and added sulfide”. *Applied and Environmental Microbiology* 83(22). doi: 10.1128/AEM.01610-17.
- Lyratzakis, A., Meier-Credo, J., Langer, JD., és Tsiotis, G. 2023. „Insights into the sulfur metabolism of *Chlorobaculum tepidum* by label-free quantitative proteomics”. *Proteomics*. doi: 10.1002/pmic.202200138.
- Macheroux, P. 1999. „UV-visible spectroscopy as a tool to study flavoproteins”. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 131:1–7. doi: 10.1385/1-59259-266-X:1.
- Macy, JM., Schröder, I., Thauer, RK., és Kröger, A. 1986. „Growth the *Wolinella succinogenes* on H<sub>2</sub>S plus fumarate and on formate plus sulfur as energy sources”. *Archives of Microbiology* 144(2):147–50. doi: 10.1007/BF00414725.

- Madden, TL., Tatusov, RL. és Zhang, J. 1996. „Applications of network BLAST server”. *Methods in Enzymology* 266:131–37. doi: 10.1016/s0076-6879(96)66011-x.
- Madigan, MT., és Jung, DO. 2009. „An overview of purple bacteria: Systematics, physiology, and habitats”. Könyv, 1. fejezet.
- Marcia, M., Ermler, U., Peng, G., és Michel, H. 2009. „The structure of *Aquifex aeolicus* sulfide:quinone oxidoreductase, a basis to understand sulfide detoxification and respiration”. *Biochemistry* 106(24):9625-9630. doi: 10.1073/pnas.0904165106.
- Marcia, M., Ermler, U., Peng, G., és Michel, H. 2010a. „A new structure-based classification of sulfide: Quinone oxidoreductases”. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics* 78(5):1073–83. doi: 10.1002/prot.22665.
- Marcia, M., Langer, JD., Parcej, D., Vogel, V., Peng, G., és Michel, H. 2010b. „Characterizing a monotopic membrane enzyme. Biochemical, enzymatic and crystallization studies on *Aquifex aeolicus* sulfide:quinone oxidoreductase”. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1798(11):2114–23. doi: 10.1016/j.bbamem.2010.07.033.
- Marreiros, BC., Sena, FV., Sousa, FM., Batista, AP., és Pereira, MM. 2016. „Type II NADH:quinone oxidoreductase family: phylogenetic distribution, structural diversity and evolutionary divergences”. *Environmental Microbiology* 18(12):4697–4709. doi: 10.1111/1462-2920.13352.
- Marreiros, BC., Sena, FV., Sousa, FM., Oliveira, ASF., Soares, CM., Batista, AP., és Pereira, MM. 2017. „Structural and functional insights into the catalytic mechanism of the type II NADH:quinone oxidoreductase family”. *Scientific Reports* 7. doi: 10.1038/srep42303.
- Mishanina, TV., Yadav, PK., Ballou, DP., és Banerjee, R. 2015. „Transient kinetic analysis of hydrogen sulfide oxidation catalyzed by human sulfide quinone oxidoreductase”. *Journal of Biological Chemistry*. doi: 10.1074/jbc.M115.682369.
- Nicholls, P. 1975. „The effect of sulphide on cytochrome aa<sub>3</sub>. Isosteric and allosteric shifts of the reduced alpha-peak.” *Biochimica et biophysica acta* 396(1):24–35. doi: 10.1016/0005-2728(75)90186-3.
- Ohtsuka, H., Shimasaki, T., és Aiba, H. 2021. „Response to sulfur in *Schizosaccharomyces pombe*”. *FEMS Yeast Research* 21(5). doi: 10.1093/femsyr/foab041.

- Ojha, S., Meng, EC., és Babbitt, PC. 2007. „Evolution of function in the »two dinucleotide binding domains« flavoproteins”. *PLoS Computational Biology* 3(7):1268–80. doi: 10.1371/journal.pcbi.0030121.
- Olas, B. 2016. „Medical functions of hydrogen sulfide”. *Advances in Clinical Chemistry* 195-210. doi: 10.1016/bs.acc.2015.12.007.
- Osipov, EM., Lilina, AV., Tsallagov, SI., Safonova, TN., Sorokin, DY., Tikhonova, TV., és Popova, VO. 2018. „Structure of the flavocytochrome c sulfide dehydrogenase associated with the copper-binding protein CopC from the haloalkaliphilic sulfuroxidizing bacterium *Thioalkalivibrio paradoxus* ArH 1”. *Acta Crystallographica Section D: Structural Biology* 74(7):632–42. doi: 10.1107/S2059798318005648.
- Palágyi-Mészáros, L. 2006. „The *Thiocapsa roseopersicina* genome project and the use of results in the hydrogenase research”. *Acta Biologica Szegediensis* 50(3–4):169.
- Clarke, PH. 1953. „Hydrogen sulphide production by bacteria”. *J Gen Microbiology* 8(3):397-407. doi: 10.1099/00221287-8-3-397.
- Pfennig, N., és Trüper, HG. 1992. „The Family *Chromatiaceae*”. *The Prokaryotes*. Springer New York. doi: 10.1007/978-1-4757-2191-1\_8.
- Pham, VH., Yong, JJ., Park, SJ., Yoon, DN., Chung, WH., és Rhee, SK. 2008. „Molecular analysis of the diversity of the sulfide:quinone reductase (sqr) gene in sediment environments”. *Microbiology* 154(10):3112–21. doi: 10.1099/mic.0.2008/018580-0.
- Prior, M., Green, F., Lopez, A., Balu, A., De Scantis, GT., és Fick, G. 1990. „Capsaicin Pretreatment Modifies Hydrogen Sulphide-Induced Pulmonary Injury in Rats”. *Toxicologic Pathology* 18(2):279-88. doi: 10.1177/019262339001800206.
- Reiffenstein, RJ., Hulbert, WC., és Roth, SH. 1992. „Toxicology of hydrogen sulfide”. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 32:109-34. doi: 10.1146/annurev.pa.32.040192.000545.
- Reinartz, M., Tschäpe, J., Brüser, T., Trüper, HG., és Dahl, S. 1998. „Sulfide oxidation in the phototrophic sulfur bacterium *Chromatium vinosum*”. *Archives of Microbiology* 170(1):59–68. doi: 10.1007/s002030050615.
- Roediger, WEW., Moore, J., és Babidge, W. 1997. „Colonic sulfide in pathogenesis and treatment of ulcerative colitis”. *Digestive Diseases and Sciences* 42(8):1571-9. doi: 10.1023/a:1018851723920.

- Sanger, F., Nicklen, S., és Coulson, AR. 1977. „DNA sequencing with chain-terminating inhibitors (DNA polymerase/nucleotide sequences/bacteriophage 4X174)”. PNAS 74(12):5463-7. doi: 10.1073/pnas.74.12.5463.
- Schütz, M., Shahak, Y., Padan, E., Hauska, G. 1997. „Sulfide-quinone reductase from *Rhodobacter capsulatus*. Purification, cloning, and expression”. Journal of Biological Chemistry 272(15):9890-4. doi: 10.1074/jbc.272.15.9890.
- Sena, FV., Sousa, FM., Oliveira, ASF., Soares, CM., Catarino, T., és Pereira, MM. 2018. „Regulation of the mechanism of type-II NADH:quinone oxidoreductase from *S. aureus*”. Redox Biology 16(02):209–14. doi: 10.1016/j.redox.2018.02.004.
- Seo, D., és Asano, T. 2018. „C-terminal residues of ferredoxin-NAD(P)<sup>+</sup> reductase from *Chlorobaculum tepidum* are responsible for reaction dynamics in the hydride transfer and redox equilibria with NADP<sup>+</sup>/NADPH”. Photosynthesis Research 136(3):275–90. doi: 10.1007/s11120-017-0462-z.
- Shahak, Y., és Hauska, G. 2008. „Sulfide oxidation from cyanobacteria to humans: Sulfide–quinone oxidoreductase (SQR)”. Sulfur metabolism in Phototrophic organisms 319–35 oldal. ISBN: 978-1-4020-6863-8. doi: 10.1007/978-1-4020-6863-8\_16.
- Shen, J., Peng, H., Zhang, Y., Trinidad, JC., és Giedroc, DP. 2016. „*Staphylococcus aureus* sqr encodes a type II sulfide:quinone oxidoreductase and impacts reactive sulfur speciation in cells”. Biochemistry. doi: 10.1021/acs.biochem.6b00714.
- Shen, Y., Chen, J., Shen, W., Chen, C., Lin, Z., és Li, C. 2020. „Molecular characterization of a novel sulfide:quinone oxidoreductase from the razor clam *Sinonovacula constricta* and its expression response to sulfide stress”. Comparative Biochemistry and Physiology Part - B: Biochemistry and Molecular Biology 239. doi: 10.1016/j.cbpb.2019.110367.
- Shuman, KE., és Hanson, TE. 2016. „A sulfide:quinone oxidoreductase from *Chlorobaculum tepidum* displays unusual kinetic properties”. FEMS Microbiology Letters 363(12):1–8. doi: 10.1093/femsle/fnw100.
- Søballe, B., Poole, RK. 2008. „Microbial ubiquinones: multiple roles in respiration, gene regulation and oxidative stress management”. Microbiology 145(1999):1817–30. doi: 10.1099/13500872-145-8-1817.
- Sousa, FM., Pereira, JG., Marreiros, BC., és Pereira, MM. 2018. „Taxonomic distribution, structure/function relationship and metabolic context of the two families of sulfide

- dehydrogenases: SQR and FCSD". *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1859(9):742–53. doi: 10.1016/j.bbabi.2018.04.004.
- Sousa, FM., Sena, FV., Batista, AP., Athayde, B., Brito, JA., Archer, M., Oliveira, ASF., Soares, CM., Catarino, T., és Pereira, MM. 2017. „The key role of glutamate 172 in the mechanism of type II NADH:quinone oxidoreductase of *Staphylococcus aureus*". *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1858(10):823–32. doi: 10.1016/j.bbabi.2017.08.002.
- Schrödinger Release 2022-2: Prime, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2023.
- Szabo, Cs. 2016. „Gasotransmitters in cancer: From Pathophysiology to experimental therapy." *Nature Reviews. Drug Discovery* 15(3):185–203. doi: 10.1038/nrd.2015.1.
- Szabo, Cs., Ransy, C., Módis, K., Andriamihaja, M., Murgheș, B., Coletta, C., Olah, G., Yanagi, K., és Bouillaud, F., 2013. „Regulation of mitochondrial bioenergetic function by hydrogen sulfide. Part I. Biochemical and physiological mechanisms". *British Journal of Pharmacology* 171(8):2099-122. doi: 10.1111/bph.12369.
- Theissen, U., Hoffmeister, M., Grieshaber, M., és Martin, W. 2003. „Single eubacterial origin of eukaryotic sulfide:quinone oxidoreductase, a mitochondrial enzyme conserved from the early evolution of eukaryotes during anoxic and sulfidic times". *Molecular Biology and Evolution* 20(9):1564–74. doi: 10.1093/molbev/msg174.
- Tikhonova, TV., Lilina, AV., Osipov, EM., Shipkov, NS., Dergousova, NI., Kulikova, OG., és Popov, VO. 2021. „Catalytic properties of flavocytochrome c sulfide dehydrogenase from haloalkaliphilic bacterium *Thioalkalivibrio paradoxus*". *Biochemistry (Moscow)* 86(3):361–69. doi: 10.1134/S0006297921030111.
- Valdés, J., Pedroso, I., Quatrini, R., Dodson, RJ., Tettelin, H., Blake, R., Eisen, JA., Holmes, DS. 2008. „*Acidithiobacillus ferrooxidans* metabolism: From genome sequence to industrial applications". *BMC Genomics* 9:597. doi: 10.1186/1471-2164-9-597.
- Van Driessche, G., Koh, M., Chen, ZW., Mathews, FS., Meyer, TE., Bartsch, RG., Cusanovich, MA., és Van Beeumen, JJ. 1996. „Covalent structure of the flavoprotein subunit of the flavocytochrome c: Sulfide dehydrogenase from the purple phototrophic bacterium *Chromatium vinosum*". *Protein Science* 5:1753:1764.
- Vande Weghe, JG., és Ow, DW. 1999. „A fission yeast gene for mitochondrial sulfide oxidation". *Journal of Biological Chemistry* 274(19):13250-7. doi: 10.1074/jbc.274.19.13250.



- Visscher, PT., Nijburg, JW., és van Gemerden, H. 1990. „Polysulfide utilization by *Thiocapsa roseopersicina*”. Archives of Microbiology 155(1):75–81. doi: 10.1007/BF00291278.
- Wakai, S., Tsujita, M., Kikumoto, M., Manchur, MA., Kanao, T., és Kamimura, K. 2007. „Purification and characterization of sulfide:quinone oxidoreductase from an acidophilic iron-oxidizing bacterium, *Acidithiobacillus ferrooxidans*”. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 71(11):2735–42. doi: 10.1271/bbb.70332.
- Walsh, BJC., Brito, JA., és Giedroc, DP. 2020. „Hydrogen sulfide signaling and enzymology”. Reference Modul in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-409547-2.14699-2.
- Wang, L., Friesner, RA., és Berne, BJ. 2011. „Replica exchange with solute scaling: A more efficient version of replica exchange with solute tempering (REST2)”. Journal of Physical Chemistry B 115(30):9431–38. doi: 10.1021/jp204407d.
- Wang, R. 2010. „Hydrogen sulfide: The third gasotransmitter in biology and medicine”. Antioxidants and Redox Signaling 12(9):1061-4. doi:10.1089/ars.2009.2938.
- Wang, R. 2002. „Two’s company, three’s a crowd: can H<sub>2</sub>S be the third endogenous gaseous transmitter?”. The FASEB Journal 16(13):1792-8. doi: 10.1096/fj.02-0211hyp.
- Wu, YT., Chiang, PW., Tandon, K., Rogozin, DY., Degermendzhy, AG., és Tang, SL. 2021. „Single-cell genomics-based analysis reveals a vital ecological role of *Thiocapsa* sp. LSW in the meromictic Lake Shunet, Siberia”. Microbial Genomics 7(12):000712. doi: 10.1099/mgen.0.000712.
- Xia, Y., Lü, C., Hou, N., Xin, Y., Liu, J., Liu, H., és Xun, L. 2017. „Sulfide production and oxidation by heterotrophic bacteria under aerobic conditions”. ISME Journal 11(12):2754–66. doi: 10.1038/ismej.2017.125.
- Yeang, HJ., Yusof, F., és Abdullah, L. 1998. „Protein purification for the Lowry assay. Acid precipitation of proteins in the presence of sodium dodecyl sulfate and other biological detergents”. Analytical Biochemistry 265(2):381–84. doi: 10.1006/abio.1998.2893.
- Zhang, M., Xue, Q., Zhang, S., Zhou, H., Xu, T., Zhou, J., Zheng, Y., Li, M., Kumar, S., Zhao, D., és Xiang, H. 2021. „Development of whole-cell catalyst system for sulfide biotreatment based on the engineered haloalkaliphilic bacterium”. AMB Express 11(1). doi: 10.1186/s13568-021-01302-9.

- Zhang, Y., Qadri, A., és Weiner, JH. 2016. „The quinone-binding site of *Acidithiobacillus ferrooxidans* sulfide:quinone oxidoreductase controls both sulfide oxidation and quinone reduction”. *Biochemistry and Cell Biology* 94(2):159–66. doi: 10.1139/bcb-2015-0097.
- Zhang, Y., és Weiner, JH. 2014. „Characterization of the kinetics and electron paramagnetic resonance spectroscopic properties of *Acidithiobacillus ferrooxidans* sulfide:quinone oxidoreductase (SQR)”. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 564:110–19. doi: 10.1016/j.abb.2014.09.016.
- Zhao, W. 2001. „The vasorelaxant effect of H<sub>2</sub>S as a novel endogenous gaseous KATP channel opener”. *The EMBO Journal* 20(21):6008–16. doi: 10.1093/emboj/20.21.6008.

## 8. Összefoglalás

A szulfid a legredukáltabb kénvegyület - bizonyos koncentráció felett a sejtek számára toxikus, annak ellenére, hogy számos fiziológiás folyamatokban fontos szerepet játszik. A szulfid szintjének szabályozásában, a homeosztázis fenntartásában a szulfid:kinon oxidoreduktázoknak (SQR) van kiemelkedő szerepe. Ezek a membránkötött enzimek az élővilágban mindenhol megtalálhatóak a növényeket kivéve. Hat alcsaládba soroljuk őket. Közös jellemzőjük az aktív centrumban található FAD kofaktor és a konzervált ciszteinek. Az SQR enzimek egy két lépéses redox reakciót katalizálnak. Az első a szulfid oxidáció vagy redukív fázis, ami során a szulfidról az elektronok a FAD kofaktorra jutnak. Ezt követi a kinon redukció vagy oxidatív fázis, amikor a kofaktorról az elektronok a prokarióták esetén a sejtmembránban, eukariótáknál a mitokondrium belső membránjában lévő kinonokra kerülnek. Az SQR enzimek közül csak néhánynak ismert a szerkezete és a működési mechanizmusukról is keveset tudunk. Tanulmányozásuk fontos az alkalmazásuk szempontjából. Többek között a humán szervezetben néhány betegség megelőzésében szerepet játszhat, például a vastagbél rák vagy a természetben a szennyvizekben a szulfid koncentráció csökkentésében vehetnek részt.

A munka során a *Thiocapsa roseopersicina* volt a modellorganizmusunk, ami egy anaerob, fototróf, bíbor kénbaktérium. Genomjában megtalálható egy VI. típusú SQR enzimet kódoló gén. A kutatócsoportunk az SqrF fehérjére kidolgozott egy homológ rekombináns fehérjetermeltetési és tisztítási módszert. Az SqrF enzimet csoportunk jellemezte biokémiai és spektroszkópiai módszerekkel. A többi vizsgált SQR enzimhez képest magasabb aktivációs energiával és szulfidhoz való affinitással rendelkezett, azonban aktivitása jelentősen alacsonyabb volt ezeknél. Kutatócsoportunkkal vizsgáltuk a konzervált ciszteinek szerepét alanin pontmutánsok létrehozásával. Ez alapján a szulfid oxidációs lépésére felállítottunk egy lehetséges katalitikus modellt, amely szintén eltért az eddig meghatározásra került SQR-ek esetében leírtakétól.

A doktori munka során célul tűztük ki a *T. roseopersicina* SqrF kinon redukciójában részt vevő aminosavak azonosítását, azok szerepének meghatározását. A kinon a C-terminális régió elhelyezkedő, hidrofób aminosavakkal bélelt csatornán keresztül kerül a FAD kofaktor közelébe, hogy az elektronok átjussanak rá. További célunk volt a C-terminális régió szerepének a megismerése. A céljaink között szerepelt a *T. roseopersicina* SqrF 163. pozíciójú glutaminsav lehetséges szerepének felderítése. Ez az aminosav az összes ismert SQR-ben konzervált, az SqrB enzimekben lizin helyettesíti. A Glu163 a szekvenenciaanalízisek és *in silico* homológia modellezés alapján az egyik konzervált cisztein közelében helyezkedik el

(*T. roseopersicina* Cys332). Ennek a ciszteinnek a szulfid oxidációban van szerepe, ezért feltételezhetően ez a glutaminsav is a redukív fázishoz köthető.

A kutatómunka főbb eredményei összegezve: A korábbi irodalmi eredmények, a decilubikinin (dUQ) szubsztráttal kristályosított SQR szerkezetek és a kutatócsoportunk által létrehozott *T. roseopersicina* SqrF homológia modell alapján azonosítottuk a kinon kötőhelyet az SqrF fehérjében. Az SQR enzimek szekvenciáinak összehasonlítása és az SqrF enzim homológia modellje alapján három aminosav, a Val331, Ile333 és Phe366 alakítja ki a kinon kötő csatornát. Az SQR-ek konzerváltságot mutatnak abban, hogy ezt a csatornát apoláris és aromás aminosavak építik fel. A legrészletesebben jellemzett, kristályosított *A. ferrooxidans* SqrA kinon kötő csatornáját két aromás fenilalanin alkotja, de más irodalmi eredmények alapján úgy tűnik, hogy nem ez az általános. A *T. roseopersicina* SqrF-ben két apoláris és egy aromás aminosav foglal helyet a dUQ feji régiójának közvetlen környezetében. Ez az elrendeződés az általánosabb az SQR fehérjékben. Ezért a *T. roseopersicina* SqrF megfelelőbb modell lenne az SQR enzimek kinon kötőhelyének megismerésére, a kinon redukciós folyamat vizsgálatára.

REST bioinformatikai módszerrel meghatároztuk, hogy a vad típusú SqrF fehérjében a Val331 és az Ile333 aminosavakkal a dUQ hidrogénkötéssel kapcsolódott, a Phe366-tal pedig hidrofób kölcsönhatást alakított ki. Továbbá a Trp369 hidrofób kötéssel kötött a dUQ decil oldalláncához. A szimulált SqrF-dUQ komplex szerkezetek alapján, ha a dUQ a valinnal kötődött, akkor az izoleucinhoz már nem tudott hozzákapcsolódni vagy fordítva. Ellenben a vizsgált 2500 szerkezet többségében a Phe366 csoporthoz mindkét esetben képes volt kötődni az elektronakceptor. Ha a homológia modellben a Phe366-t a kisebb térigényű alaninra cseréltük, akkor kölcsönhatásba léphetett a dUQ olyan aminosavakkal is, melyekkel a vad típusú SqrF-ben nem. Feltehetően azért, mert a régió szerkezete flexibilisebbé válhatott és új utak nyílhattak meg a dUQ molekula számára a fehérjébe való belépésre, és emiatt a csatornától távolabb elhelyezkedő aminosavakkal is képes volt kötést létrehozni.

A bioinformatikai eredmények alátámasztására az azonosított aminosavak pontmutánsait hoztuk létre irányított helyspecifikus mutagenézissel. Mindhárom kinon kötő csatornát felépítő aminosavat az egyik legegyszerűbb szerkezetű aminosavra, az alaninra cseréltük. Továbbá a Val331 és Ile333 aminosavakat fenilalaninnal helyettesítettük. A Phe366-t az aromás tirozinra is lecseréltük. Valamint létrehoztunk minden variációban dupla-, és egy tripla mutánst is. Mindemellett eltávolítottuk a C-terminális régió egyetlen  $\alpha$ -hélixét (CTD) azért, hogy megvizsgáljuk annak szerepét és hiányának hatását a membránhoz való horgonyzódásban. Azokat az enzimváltozatokat, amelyek az I333A mutációt hordozták nem

sikerült tisztítani. Az SqrF CTD fehérje a többi tisztított SqrF variánshoz hasonlóan a membránhoz kapcsolódott. Ez azért meglepő, mert a *C. maquilingensis* SqrC fehérje esetén az egyik vagy mindkét  $\alpha$ -hélix eltávolítása szolubilis, inaktív fehérjét eredményezett. A sikeresen tisztított SqrF variánsok kovalensen kötötték a FAD-ot az SDS-PAGE alapján. A kofaktor kötődése a fehérjékhez az abszorpciós spektrumuk alapján is igazolható volt. A CTD mutáns spektroszkópiái adatai szerint a többi fehérje mintához képest jelentősen nagyobb arányban tartalmazott redukált állapotú FAD-ot kötő fehérjéket, DQ hozzáadásával azonban képes volt teljesen oxidált állapotba kerülni. Tehát csak a redox állapota tért el a többi variánstól. A tisztított SqrF variánsok szulfid függő DQ és dUQ redukáló aktivitása alacsonyabb volt a vad típushoz képest. A CTD variáns kisebb aktivitáscsökkenést eredményezett, mint az  $\alpha$ -hélixen elhelyezkedő Phe366 megváltoztatása. A CTD mutáns hasonló kinetikai paraméterekkel rendelkezett, mint a vad típusú SqrF. Azonban a hőmérsékletfüggés adatok alapján alacsonyabb hőmérsékleten érte el a maximum aktivitást a vad típushoz és az összes tisztított SqrF variánshoz képest. A CTD mutáns aktivációs energiája is jelentősen megemelkedett. Aktivitásának a hőmérséklet emelkedésére mutatott nagyfokú érzékenysége miatt vizsgáltuk a deléciós mutáns fehérje hőstabilitását, amely a vad típushoz nagyon hasonló. Mindezekből megállapítható, hogy a C-terminális  $\alpha$ -hélix eltávolításával a szerkezet stabil maradt. Feltételezhetően ebben a mutánsban nagyobb lesz a hely a dUQ számára a fehérje belsejébe jutáshoz és több aminosavval is kapcsolatba tud lépni az aktív centrumban, azonban az elektronátadás valószínűsége kisebb, mert ehhez kedvezőtlenebb a FAD-kinon helyzet.

Összegezve a Val331, Ile333, Phe366 alakítják ki a kinon kötő csatornát a *T. roseopersicina* SqrF-ben. Az Ile333 közvetetten hatással lehet a szulfid oxidációra is. Mindhárom aminosav részt vesz a szubsztrát orientálásában. A C-terminális  $\alpha$ -hélix hiánya egy szélesebb csatornát eredményez a fehérjében. Ebben a csatornában is el tudnak jutni a kinon molekulák az SqrF enzim aktív centrumában lévő FAD kofaktor izoalloxazin gyűrűjéhez. Azonban ebben az esetben a kinon nem megfelelő orientációban is helyet foglalhat a fehérjében, ezért az elektronátadás valószínűsége csökken. Ennek a régióknak a membránhoz horgonyzódásban is szerepe van, ezt a funkciót azonban nem csak ez az  $\alpha$ -hélix látja el, ugyanis hiányában membrán kötött állapotban marad a fehérje, de sokkal könnyebben szolubilizálható.

A konzervált ciszteineken kívül az aktív centrumban levő konzervált aminosav közül a Glu163-nak is szerepe van a katalízis reduktív fázisában. Ennek a glutaminsavnak a funkcióját kísérletesen még nem vizsgálták az SQR enzimekben. A Glu163 szerepét az SqrF fehérjében pontmutánsok segítségével vizsgáltuk. A glutaminsavat alaninra, aszparigiansavra, lizinre, glutaminra és szerinre cseréltük. Az SqrF E163K mutánst a membrán frakcióban lehetett

azonosítani, azonban nem sikerült tisztítani. Az SqrF E163D-t több sejtvonalából is tisztítottunk, azonban nagyon kis mennyiségű tisztított fehérje mintát tudtunk előállítani ebből az enzimváltozatból. Az SqrF E163A és SqrF E163S minták csak oxidált állapotú FAD-ot kötő fehérjéket tartalmaztak a 360 és 450 nm csúcsok alapján. Az SqrF E163Q spektruma alapján redukált állapotú fehérjék is voltak a mintában. Az SqrF E163A nátrium-ditionittal redukálható, DQ-val oxidálható volt, azonban szulfid jelenlétében nem változott a spektruma, tehát a katalízis folyamata, a szulfid és a FAD kofaktor közti elektron transzfer a glutaminsav hiányában nem ment végbe. Az enzimaktivitást vizsgálva DQ-val egyik variánsnál sem volt mérhető aktivitás. A dUQ-val pedig az abiotikus reakciónál kisebb sebességű kinon redukció volt megfigyelhető a reakcióelegyekben, amely az enzimmennyiség növelésével és/vagy a dUQ koncentráció csökkentésével tovább csökkent. Az SqrF E163S mutációt hordozó enzim jelenlétében szinte nem történt kumulatív kinon redukció.

Összegezve eredményeinket, a Glu163 a *T. roseopersicina* SqrF enzim katalízisének szulfid oxidációs lépésében vesz részt. Megváltoztatásával a szulfid jelenlétében természetes körülmények között végbemenő kinon redukciónál alacsonyabb sebességű reakciót katalizáló enzimváltozatok jönnek létre. Feltételezhető, hogy a Glu163 cseréjének hatására az enzim képes a redukált kinont oxidálni oxidált állapotú kén, mint elektronakceptor közreműködésével.

## 9. Summary

Sulfide - as the most reduced sulfur compound - is extremely toxic for cells over a certain concentration despite it has important role in various physiological processes. Sulfide:quinone oxidoreductases (SQR) are critical enzymes in controlling cellular sulfide levels and can be involved in maintaining of homeostasis. These ancient, membrane-bound enzymes are ubiquitous in all organisms of life except plants. SQR proteins are classified into six subfamilies. SQRs have common characteristic motifs: a FAD cofactor and conserved internal cysteines in the active centre of the enzyme. SQR enzymes catalyze a complex two-step redox reaction. The first sulfide oxidation or reductive phase of the redox reaction is the two-electron get over from the sulfide to the FAD cofactor under oxidation of sulfide to elemental sulfur and reduction of FAD. The second quinone reduction or oxidative phase is transfer of two electrons from the reduced FAD to the quinone molecule which located within the cytoplasmic membrane of prokaryotes or the inner mitochondrial membrane of eukaryotes. Only several SQRs have been structurally characterized and the mechanism of the catalyzed reactions of SQRs are poorly understood. Investigation of SQR enzymes is important in the aspect of their application. SQRs may have role i.a. in prevention of some human diseases, for example colon cancer or in reduction of sulfide concentration of sewage in nature.

Modelorganism for my research is *Thiocapsa roseopersicina* which is an anaerobic, photosynthetic purple sulfur bacterium. In the genome of *T. roseopersicina*, a type VI SQR protein encoding gene has been identified. Our group developed a protocol for homologous recombinant protein expression and purification. Our group analyzed the SqrF enzyme biochemical and spectroscopic methods. This *T. roseopersicina* SqrF has higher activation energy and affinity to sulfide, however the activity was lower as compared to other SQR enzymes. We examined the role of conserved cysteine residues via cysteine to alanine mutant protein variants. We created a proposed model for catalytic mechanism of sulfide oxidation step of *T. roseopersicina* SqrF that is different than the other SQRs proposed catalytic processes.

The aim of this PhD thesis is to understand the molecular background of the quinone reduction phase of type VI SQR-catalyzed redox reactions. During this process quinone enter into the active centre near the FAD for the electron transfer via a channel which is forming by hydrophobic amino acids in the C-terminal domain. Our aim was to identify the amino acids of quinone binding site and to disclose the role of the C-terminal region of *T. roseopersicina* SqrF in this process. Additional aim was to get deeper insight into the role in sulfide oxidation of Glu163 of *T. roseopersicina* SqrF. This amino acid is conserved amongst all SQRs, but it is

replaced by lysine in SqrB enzymes. Based on sequence analysis and *in silico* homology model this Glu163 is positioned next to one of the conserved cysteine residues (*T. roseopersicina* Cys332). This cysteine has role in sulfide oxidation phase of catalytic process, and this is the reason why it is assumed that this glutamic acid has a role in reductive phase.

Summarize of the main results of my research. Quinone binding site of SqrF was identified based on the results of previous studies, structure of crystallized SQRs with decylubiquinone (dUQ) and the homology model of *T. roseopersicina* SqrF. According to the sequence comparison of SQR enzymes and homology model of SqrF, the quinone binding site is formed by three amino acids: Val331, Ile333 and Phe366. This highly conserved quinone channel is built by apolar and aromatic amino acid residues. *A. ferrooxidans* SqrA is the well-characterized and crystallized SQR, in which two aromatic phenylalanine residues on both sides of the quinone binding site near the benzoquinone ring of dUQ have been identified. This arrangement was nearly identical to the quinone channels characterized previously. For this reason, *T. roseopersicina* SqrF is a better model for investigation of quinone binding site and quinone reduction process of SQR enzymes because in this case the arrangement is more common: two apolar amino acids and an aromatic residue near the head group of dUQ.

REST, being a bioinformatic analysis method, indicated that Val331 and Ile333 alternately connected with the dUQ via hydrogen bonds and Phe366 bound the quinone via hydrophobic interaction. Furthermore, Trp369 interacted with the decyl chain of dUQ via hydrophobic bond. Based on simulation of SqrF-dUQ complex structures, Phe366 binds the quinone in most of the investigated 2500 structure. If Phe366 was replaced by alanine, which size is smaller in homology model, the dUQ could be able to interact to new residues in the quinone channel. Presumably dUQ could get deeper near the FAD in the active centre of SqrF due to the more flexibility of SqrF structure.

To support the bioinformatical results, amino acid likely participating in quinone binding were substituted by site-directed mutagenesis in the wild type SqrF. Alanine variants for each of three primary candidates for binding the quinone in *T. roseopersicina* SqrF were generated. Furthermore, Val331 and Ile333 were replaced by phenylalanine and Phe366 by aromatic tyrosine. In addition, we created double alanine point mutants and a triple alanine point mutant. Furthermore, a C-terminal  $\alpha$ -helix deletion *T. roseopersicina* SqrF variant was generated for understanding the role of the helix in membrane anchoring. The variants containing I333A mutation could not be purified. The CTD variant could be purified from the membrane fraction similarly to the other mutants. It was surprising since truncation of one or two  $\alpha$ -helices from the C-terminal region of *C. maquilingsis* SqrC resulted in a soluble,



cytoplasmic protein without catalytic activity. The purified SqrF variants bound the FAD covalently based on SDS-PAGE analysis. The absorption spectra of pure SqrF variants were recorded to verify the presence of the cofactor. According to spectroscopic data, the CTD variant had higher proportion of reduced proteins compared to the other SqrF samples. After the addition of DQ to the CTD mutant could be fully oxidized. The CTD mutant was different from the other SqrF variants only in the redox state. All SqrF variants catalyzed the sulfide dependent DQ or dUQ reduction with lower specific activity than the wild type SqrF enzyme did. The CTD mutant had a smaller effect on the quinone reducing activity than the Phe366 point mutants (F366A, F366Y). It was unexpected, because this Phe366 residue is positioned on the single  $\alpha$ -helix of *T. roseopersicina* SqrF. The CTD variant exhibited similar kinetic parameters as the wild type SqrF enzyme. However, the CTD mutant had the lowest temperature optimum and highest activation energy as compared with wild type and SqrF variants. Due to temperature sensitivity of CTD mutant we examined the thermostability. The thermostabilities of CTD variant and the wild type SqrF enzyme were similar, indicating that deletion of C-terminal  $\alpha$ -helix had no destabilizing effect on the enzyme structure. Presumably, the CTD mutant had a larger quinone binding pocket and dUQ might be able to enter the channel more easily and could interact with more amino acids in the active centre of the enzyme. However, the electron transfer and stability of the enzyme-ligand complex were impaired.

In conclusion, the Val331, Ile333 and Phe366 residues participate in the formation of the quinone binding site of *T. roseopersicina* SqrF. Ile333 has an indirect effect on the sulfide oxidation step of catalytic process. These three residues play a role in the orientation of substrate by keeping the benzoquinone ring of quinone in proper position. Removing the C-terminal  $\alpha$ -helix reveals a wider quinone channel. The dUQ is able to get closer to the isoalloxazine ring of FAD in the active centre and may interact with more amino acids. The dUQ can enter the quinone channel in various orientations which result in impaired electron transfer. This C-terminal region has a minor effect on membrane anchoring, since deletion of this region eventuate membrane bound SqrF enzyme, but it could be solubilized more easily.

Near to the conserved cysteine residues other amino acids may also participate in the reductive phase of catalytic process, for example Glu163. Function of this glutamic acid have never been investigated with experimental methods. Glutamic acid point mutants were constructed to investigate the function of this residue in *T. roseopersicina* SqrF. It was replaced by alanine, asparatic acid, lysine, glutamine, and serine by site-directed mutagenesis. SqrF E163K was detected in the membrane fraction by Western analysis, but it could not be purified. SqrF E163D variant was purified from more cell lines, but the purified protein amount was

extremely low. SqrF E163A and SqrF E163S samples had almost fully oxidized proteins according to the absorption peaks of 360 and 450 nm. The absorption spectra of the SqrF E163Q variant differed, it had higher proportion of reduced proteins. To estimate the redox state of the purified SqrF E163A mutant, the protein was reduced by sodium-dithionite and re-oxidized by DQ. But the spectra did not change after sulfide addition. These data indicated that lack of this glutamic acid altered the catalytic process, electron transfer between sulfide and FAD is not occurred. None of the Glu163 variant had activity with DQ. Interestingly, all glutamic acid mutants had lower dUQ reducing activity than the activity of abiotic reaction. Furthermore, this activity of Glu163 variants were more appreciable by increasing amount of enzyme and/or by decreasing the dUQ concentration. Presence of SqrF E163S variant cumulative quinone reduction was not measured.

In conclusion, Glu163 has role in the sulfide oxidation step of catalytic mechanism of *T. roseopersicina* SqrF. Substituting this residue results in *T. roseopersicina* SqrF catalyzing the dUQ reduction less than the abiotic reaction. Probably the reduced quinone could get into oxidized state. Presumably *T. roseopersicina* SqrF Glu163 mutant may catalyze a reduced quinone oxidation in presence of oxidized sulfur as electron acceptor.

## 10. Függelék

### 10.1 Felhasznált baktérium törzsek

Baktérium törzs	Genotípus	Referencia
<i>Escherichia coli</i>		
<b>XL-1 Blue MRF<sup>'</sup></b>	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [ <i>F'</i> <i>proAB lacI<sup>q</sup></i> ]  ZΔM15 Tn10 (Tet <sup>r</sup> )	Stratagene
<b>S17-1 Δ pir</b>	294 ( <i>recA pro res mod</i> ) Tp <sup>r</sup> Sm <sup>r</sup> (pRP4-2-Tc:: <i>Mu-Km</i> ::Tn7) λ <i>pir</i>	(Palágyi-Mészáros 2006)
<i>Thiocapsa roseopersicina</i>		
<b>FOQRON</b>	<i>HynSL::Sm<sup>r</sup> hupSL::Gm<sup>r</sup></i> <i>ΔfccΔsqrDΔsqrF</i>	(Duzs és mtsai. 2021)
<b>V331A</b>	FOQRON + pDSQNNSV331A	Jelen dolgozat
<b>V331F</b>	FOQRON + pDSQNNSV331F	Jelen dolgozat
<b>I333A</b>	FOQRON + pDSQNNSI333A	Jelen dolgozat
<b>I333F</b>	FOQRON + pDSQNNSI333F	Jelen dolgozat
<b>F366A</b>	FOQRON + pDSQNNSF366A	Jelen dolgozat
<b>F366Y</b>	FOQRON + pDSQNNSF366Y	Jelen dolgozat
<b>V331AI333A</b>	FOQRON + pDSQNNSV331AI333A	Jelen dolgozat
<b>V331AF366A</b>	FOQRON + pDSQNNSV331AF366A	Jelen dolgozat
<b>I333AF366A</b>	FOQRON + pDSQNNSI333AF366A	Jelen dolgozat
<b>V331AI333AF366A</b>	FOQRON + pDSQNNSV331AI333AF366A	Jelen dolgozat
<b>CTD</b>	FOQRON + pDSQNNSCTD	Jelen dolgozat
<b>E163A</b>	FOQRON + pDSQNNSE163A	Jelen dolgozat
<b>E163D</b>	FOQRON + pDSQNNSE163D	Jelen dolgozat

<b>E163K</b>	FOQRON + pDSQNNSE163K	Jelen dolgozat
<b>E163Q</b>	FOQRON + pDSQNNSE163Q	Jelen dolgozat
<b>E163S</b>	FOQRON + pDSQNNSE163S	Jelen dolgozat

## 10.2 Felhasznált plazmidok felsorolása

<b>Plazmidok</b>	<b>Genotípus</b>	<b>Referencia</b>
<b>pBluescriptSK +</b>	ColE1, Amp <sup>r</sup>	Stratagene
<b>pDSK6CRTKm</b>	pDSK509 alapú expressziós vektor, amely a <i>T. roseopersicina crtD</i> gén promóterét tartalmazza, Km <sup>r</sup>	(Balogh személyes közlés)
<b>pBSQNNNS</b>	N-terminálison StrepII affinitás peptiddel fúzionáltatott <i>sqrF</i> gén a pBluescriptSK(+) plazmidban	(Duzs és mtsai. 2018)
<b>pBSQNNNSV331A</b>	V331A pontmutáció a pBSQNNNS vektorban	Jelen dolgozat
<b>pBSQNNNSV331F</b>	V331F pontmutáció a pBSQNNNS vektorban	Jelen dolgozat
<b>pBSQNNNSI333A</b>	I333A pontmutáció a pBSQNNNS vektorban	Jelen dolgozat
<b>pBSQNNNSI331F</b>	I333F pontmutáció a pBSQNNNS vektorban	Jelen dolgozat
<b>pBSQNNNSF366A</b>	F366A pontmutáció a pBSQNNNS vektorban	Jelen dolgozat
<b>pBSQNNNSF366Y</b>	F366Y pontmutáció a pBSQNNNS vektorban	Jelen dolgozat
<b>pBSQNNNSV331AI333A</b>	V331AI333A pontmutáció a pBSQNNNS vektorban	Jelen dolgozat
<b>pBSQNNNSV331AF366A</b>	V331AF366A pontmutáció a pBSQNNNS vektorban	Jelen dolgozat

<b>pBSQNNSI333AF366A</b>	I333AF366A pontmutáció a pBSQNNNS vektorban	Jelen dolgozat
<b>pBSQNNV331AI333AF366A</b>	V331AI333AF366A pontmutáció a pBSQNNNS vektorban	Jelen dolgozat
<b>pBSQNNCTD</b>	C-terminális $\alpha$ -hélix deléziós mutáció a pBSQNNNS vektorban	Jelen dolgozat
<b>pBSQNNSE163A</b>	E163A pontmutáció a pBSQNNNS vektorban	Jelen dolgozat
<b>pBSQNNSE163D</b>	E163D pontmutáció a pBSQNNNS vektorban	Jelen dolgozat
<b>pBSQNNSE163K</b>	E163K pontmutáció a pBSQNNNS vektorban	Jelen dolgozat
<b>pBSQNNSE163Q</b>	E163Q pontmutáció a pBSQNNNS vektorban	Jelen dolgozat
<b>pBSQNNSE163S</b>	E163S pontmutáció a pBSQNNNS vektorban	Jelen dolgozat
<b>pBSQNNSE163K</b>	E163K pontmutáció a pBSQNNNS vektorban	Jelen dolgozat
<b>pBSQNNSE163Q</b>	E163Q pontmutáció a pBSQNNNS vektorban	Jelen dolgozat
<b>pBSQNNSE163S</b>	E163S pontmutáció a pBSQNNNS vektorban	Jelen dolgozat
<b>pDSQNNNS</b>	N-terminálison StrepII affinitás peptiddel fuzionáltatott <i>sqrF</i> gén a pDSK6CrtKm expressziós vektorban, Km <sup>r</sup>	(Duzs és mtsai. 2018)
<b>pDSQNNV331A</b>	V331A pontmutáció a pDSQNNNS expressziós vektorban	Jelen dolgozat
<b>pDSQNNV331F</b>	V331F pontmutáció a pDSQNNNS expressziós vektorban	Jelen dolgozat

<b>pDSQNNSI333A</b>	I333A pontmutáció a pDSQNNNS expressziós vektorban	Jelen dolgozat
<b>pDSQNNSI331F</b>	I333F pontmutáció a pDSQNNNS expressziós vektorban	Jelen dolgozat
<b>pDSQNNSEF366A</b>	F366A pontmutáció a pDSQNNNS expressziós vektorban	Jelen dolgozat
<b>pDSQNNSEF366Y</b>	F366Y pontmutáció a pDSQNNNS expressziós vektorban	Jelen dolgozat
<b>pDSQNNSEV331AI333A</b>	V331AI333A pontmutáció a pDSQNNNS expressziós vektorban	Jelen dolgozat
<b>pDSQNNSEV331AF366A</b>	V331AF366A pontmutáció a pDSQNNNS expressziós vektorban	Jelen dolgozat
<b>pDSQNNSEI333AF366A</b>	I333AF366A pontmutáció a pDSQNNNS expressziós vektorban	Jelen dolgozat
<b>pDSQNNSEV331AI333AF366A</b>	V331AI333AF366A pontmutáció a pDSQNNNS expressziós vektorban	Jelen dolgozat
<b>pDSQNNSECTD</b>	C-terminális $\alpha$ -hélix deléziós mutáció a pDSQNNNS expressziós vektorban	Jelen dolgozat
<b>pDSQNNSE163A</b>	E163A pontmutáció a pDSQNNNS expressziós vektorban	Jelen dolgozat
<b>pDSQNNSE163D</b>	E163D pontmutáció a pDSQNNNS expressziós vektorban	Jelen dolgozat
<b>pDSQNNSE163K</b>	E163K pontmutáció a pDSQNNNS expressziós vektorban	Jelen dolgozat
<b>pDSQNNSE163Q</b>	E163Q pontmutáció a pDSQNNNS expressziós vektorban	Jelen dolgozat
<b>pDSQNNSE163S</b>	E163S pontmutáció a pDSQNNNS expressziós vektorban	Jelen dolgozat
<b>pDSQNNSE163K</b>	E163K pontmutáció a pDSQNNNS expressziós vektorban	Jelen dolgozat
<b>pDSQNNSE163Q</b>	E163Q pontmutáció a pDSQNNNS expressziós vektorban	Jelen dolgozat
<b>pDSQNNSE163S</b>	E163S pontmutáció a pDSQNNNS expressziós vektorban	Jelen dolgozat

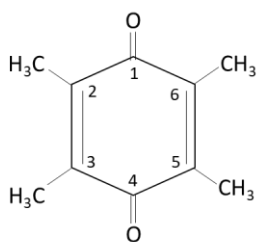
### 10.3 Felhasznált oligonukleotidok és szekvenciáik

Név	Szekvencia (5'-3')
<b>onV331AF</b>	5'CTTCAAGGTCGAGCTGGCGTGCATCGTCGACGCCAAC3'
<b>onV331AR</b>	5'GTTGGCGTCGACGATGCACGCCAGCTCGACCTGAAG3'
<b>onV331AE</b>	5'GGCGTCGACGATGCACG3'
<b>onV331FF</b>	5'GACCTTCAAGGTCGAGCTGTTCTGCATCGTCGACGCCAACG3'
<b>onV331FR</b>	5'CGTTGGCGTCGACGATGCAGAACAGCTCGACCTGAAGGTC3'
<b>onV331FE</b>	5'GACCTTCAAGGTCGAGCTGT3'
<b>onI333AF</b>	5'GAGACCTTCAAGGTCGAGCTGGTCTGCGCCGTCGACGCCAACGATACGGGCAT GCTG3'
<b>onI333AR</b>	5'CAGCATGCCCGTATCGTTGGCGTCGACGGCGCAGACCAGCTCGACCTGAAGGT CTC3'
<b>onI333AE</b>	5'GTTGGCGTCGACGGCGCAGA3'
<b>onI333FF</b>	5'GAGACCTTCAAGGTCGAGCTGGTCTGCTTCGTCGACGCCAACGATACGGGCATG CTG3'
<b>onI333FR</b>	5'CAGCATGCCCGTATCGTTGGCGTCGACGAAGCAGACCAGCTCGACCTGAAGGT CTC3'
<b>onI333FE</b>	5'CAAGGTCGAGCTGGTCTGCT3'
<b>onF366AF</b>	5'CACTGGATGAAGCTCGGCGCCGAGTGGTGGTATCTGC3'
<b>onF366AR</b>	5'GCAGATAACCACCACTCGGCGCCGAGCTTCATCCAGTG3'
<b>onF366AE</b>	5'CAGATAACCACCACTCGGC3'
<b>onF366YF</b>	5'CACTGGATGAAGCTCGGCTACGAGTGGTGGTATCTGC3'
<b>onF366YR</b>	5'GCAGATAACCACCACTCGTAGCCGAGCTTCATCCAGTG3'
<b>onF366YE</b>	5'GCAGATAACCACCACTCGT3'
<b>onCTDF</b>	5'CAACTGGGTGCTGCCCTCGACATGATGATGACGGTTCTTCCACTGGATGAAG3'
<b>onCTDR</b>	5'CTTCATCCAGTGGAAGAACCGTCATCATCATGTCGAGGGCAGCACCCAGTTG3'
<b>onCTDE</b>	5'GAAGAACCGTCATCATC3'
<b>onE163AF</b>	5'GCGCGGCGGACCCATCTTCGATTTCATCTTTGGGATGGACAG3'

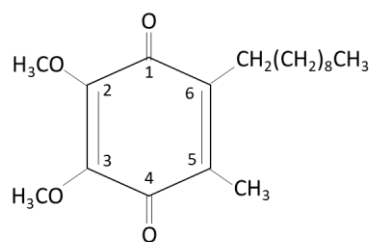
<b>onE163AR</b>	5'CTGTCCATCCCAAAGATGAACGTGAAGATGGGTCCGCCGCGC3'
<b>onE163AE</b>	5'GCCGATCCCAAAGATGAACG3'
<b>onE163DF</b>	5'GCGCGGCGGACCCATCTTCGACTTCATCTTTGGGATGGACAG3'
<b>onE163DR</b>	5'CTGTCCATCCCAAAGATGAAGTCGAAGATGGGTCCGCCGCGC3'
<b>onE163DE</b>	5'TGTCCATCCCAAAGATGAAG3'
<b>onE163KF</b>	5'GCGCGGCGGACCCATCTTCAAGTTCATCTTTGGGATGGACAG3'
<b>onE163KR</b>	5'CTGTCCATCCCAAAGATGAACTTGAAGATGGGTCCGCCGCGC3'
<b>onE163KE</b>	5'GCGCGGCGGACCCATCTTCA3'
<b>onE163QF</b>	5'GCGCGGCGGACCCATCTTCCAGTTCATCTTTGGGATGGACAG3'
<b>onE163QR</b>	5'CTGTCCATCCCAAAGATGAACTGGAAGATGGGTCCGCCGCGC3'
<b>onE163QE</b>	5'TCCATCCCAAAGATGAACTG3'
<b>onE163SF</b>	5'CGATGCGCGGCGGACCCATCTTCTCGTTCATCTTTGGGATGGACAG3'
<b>onE163SR</b>	5'CTGTCCATCCCAAAGATGAACGAGAAGATGGGTCCGCCGCGCATCG3'
<b>onE163SE</b>	5'GTCCATCCCAAAGATGAACG3'

#### 10.4 A munka során előforduló kinonok szerkezete

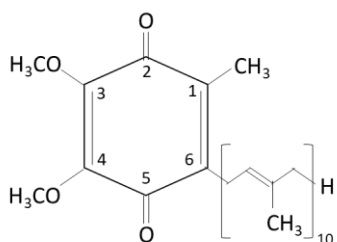
Durokinon



Decilubikinon



Ubidekarenon (decil koenzim Q)



Ubikinon-8

