

# **A hidrogenáz enzim autokatalitikus működésének vizsgálata**

Ph. D. tézisfüzet

*Készítette:*

Pankotai-Bodó Gabriella

*Témavezető:*

Dr. Bagyinka Csaba

Biológia Doktori Iskola

MTA Szegedi Biológiai Központ, Biofizikai Intézet

Szeged

2009

## Bevezetés

A hidrogenázok a lehető legegyszerűbb reakciót katalizáló enzimek, protonokból és elektronokból hidrogént képesek létrehozni (hidrogén fejlesztés), illetve a hidrogént protonokra és elektronokra bontják (hidrogén oxidáció). Intenzív kutatásuk körülbelül 25 évvel ezelőtt kezdődött, s jelenleg is tart. Az alternatív energia előállításai lehetőségek kutatásának fontosságát a kifogyóban lévő kőolaj és földgáz készletek is indokolják, mivel a hidrogén igen „környezetbarát” energiahordozó, oxidációjakor csak víz keletkezik. A biotechnológiai alkalmazásokban ugyanakkor a hidrogenázok hidrogén fejlesztő és hidrogén oxidáló aktivitását egyaránt kihasználják. Hidrogént próbálnak előállítani *in vivo* rendszerekben fotoszintetizáló mikroorganizmusok segítségével, vagy mesterséges rendszerekben immobilizált hidrogenázzal. Hidrogén felhasználásával a hidrogenázok redukált kofaktorok előállítására képesek, felhasználják őket denitrifikálásra és szennyvíz kezelésére is. Az üzemanyag cellákban kiválthatják a hidrogén oxidálására használt drága platinát.

Ahhoz, hogy egy enzim *in vitro* rendszerben hatékonyan működjön fontos tudni, hogy milyen körülmények között működik megfelelően és ismerni kell az enzim működés mechanizmusát is. Annak ellenére, hogy a hidrogenázokat már az 1930-as évek óta ismerjük, aktivitás és szerkezet vizsgálatuk jelenleg is tart. Oxigénre nagyon érzékeny fehérjék, és már a korai aktivitás mérési

kísérleteknél kiderült, hogy nem jellemezhetőek a hagyományos Michaelis-Menten kinetikával. Az eltérő kinetikai tulajdonságokat a közelmúltban egy autokatalitikus mechanizmussal magyarázni lehetett.

## Célkitűzés

Munkám célja az volt, hogy a *Thiocapsa roseopersicina* Hyn hidrogenázának prion típusú autokatalízisét igazoljam és új vékonyréteg kísérleti rendszer kialakításával megvizsgáljam az autokatalitikus mintázatot különböző körülmények között, vagyis meghatározzam az autokatalitikus lépést befolyásoló faktorokat.

E célok eléréséhez a következő tennivalókat és kísérleteket terveztem:

1. új vékonyréteg kísérleti rendszer kialakítása, hogy a frontsebességet pontosan meg tudjuk határozni,
2. a frontsebesség enzimkoncentrációtól való függésének vizsgálata az új vékonyréteg kísérleti rendszerben, hogy igazoljuk az autokatalizátor fehérje természetét,
3. a frontsebesség elektron akceptor koncentrációtól, hidrogén koncentrációtól és hidrogénion koncentrációtól való függésének vizsgálata az új vékonyréteg kísérleti rendszerben,

4. a Hofmeister sorozatból származó anionok autokatalitikus mintázatra és frontsebességre gyakorolt hatásának a vizsgálata az új vékonyréteg kísérleti rendszerben,
5. az autokatalitikus fehérje-fehérje kölcsönhatás során kialakuló fehérje komplexek kimutatása egy fehérje keresztkötési technika segítségével (PICUP, photo-induced cross-linking of unmodified proteins),
6. konformáció változás kimutatása a hidrogenáz hidrogénnel történő aktiválása során dinamikus fényszórás (DLS, dynamic light scattering) mérésekkel,
7. olyan reakciókörülmények keresése, melyek között a hidrogenáz reakció oszcilláló viselkedést mutat,
8. újabb kinetikai modellek elemzésével az autokatalitikus kölcsönhatás elhelyezése a hidrogenáz reakcióban.

## **Módszerek**

A különböző körülmények (eltérő enzim koncentráció, elektron akceptor koncentráció, hidrogén koncentráció és hidrogénion koncentráció; kaotróp, kozmotróp és semleges sók) között kialakuló autokatalitikus mintázatot és az autokatalitikus frontsebességet az általunk épített vékonyréteg kísérleti rendszerben vizsgáltam. Az autokatalitikus frontsebesség meghatározására egy,

Dr. Bagyinka Csaba által MATLAB-ban kifejlesztett programot használtam.

Az autokatalitikus fehérje kölcsönhatás során kialakuló fehérje-fehérje komplex kimutatására egy ismert fehérje keresztkötési módszert alkalmaztam (PICUP), és a keresztkötési kísérleteket az általunk összeállított megvilágítási rendszerben optimalizált körülmények között végeztem el.

A konformáció változás létezését egy dinamikus fényszóródást mérő készülékkel vizsgáltam meg a hidrogenáz különböző állapotaiban, és az adatokat a készülék saját szoftverével elemeztem ki.

A kinetikai egyenletek megoldásához a differenciálegyenleteket a CVODE illetve a MATLAB programmal számoltuk ki.

## **Eredmények**

Összeállítottam egy vékonyréteg kísérleti rendszert, melyben megbízhatóan meg lehet határozni az autokatalitikus reakció során a frontsebességet.

A Hyn hidrogenáz prion típusú autokatalízisének igazolását célzó kísérletekben a következő eredményeket kaptam:

- az autokatalizátor fehérje természetét (az autokatalizátor egy enzimforma) és így egy fehérje-fehérje kölcsönhatást igazol,

hogy a frontsebesség négyzetgyökösen függ az enzimkoncentrációtól,

- fehérje keresztkötési kísérletekkel sikeresen kimutattam egy, az enzim aktiválása folyamán kialakuló fehérje komplexet, ami valószínűleg két kis alegység kölcsönhatásának eredménye,
- a dinamikus fényszóródás mérések nem mutattak nagymértékű konformáció változást az enzim aktiválása során,
- mindhárom típusú (kaotróp, kozmotróp, semleges) só befolyásolta az autokatalitikus mintázatot, a frontsebességre viszont csak a kaotróp NaSCN koncentrációjának változtatása volt szignifikáns hatással, ami alapján azt a következtetést vontam le, hogy az autokatalitikus kölcsönhatást a fehérjeszerkezet túlzott fellazulása gátolja.

A vékonyréteg kísérleti rendszerben megvizsgáltam a frontsebesség függését a különböző körülményektől:

- az elektron akceptor koncentráció növelésének hatására a frontsebesség csökkent, ami arra utal, hogy az autokatalizátor enzimformával az elektron akceptor közvetlen kölcsönhatásba lép, és ez a kölcsönhatás valószínűleg a disztális FeS kockán keresztül történik,
- a hidrogén koncentráció változása nem volt szignifikáns hatással az autokatalitikus reakcióra,

- a hidrogénion változtatásával a frontsebesség is változott, de erre egyértelmű magyarázatot jelenleg nem lehet adni, a hidrogéniont ugyanis figyelembe kell venni, úgy is mint a reakció egyik termékét, és mint fehérjeszerkezetet meghatározó tényezőt is.

Enzim kinetikai modelleket állítottunk fel az autokatalitikus lépés helyének meghatározására az enzimcikluson belül vagy kívül. Mindkét modell *in silico* elemzése a kísérleti adatokkal egybehangzó eredményt hozott.

A vékonyréteg kísérleti rendszerben sikerült olyan reakciókörülményeket találni, melyek között csillapított oszcillációt tapasztaltam, amely az autokatalitikus folyamatokra jellemző tulajdonság.

## A dolgozat témájához szorosan kapcsolódó közlemények

**Bodó G**, Branca RM, Tóth Á, Horváth D & Bagyinka Cs (2009) Concentration-dependent front velocity of the autocatalytic hydrogenase reaction. *Biophys J* **96**, 4976-4983.

Ósz J, **Bodó G**, Branca RM & Bagyinka Cs (2005) Theoretical calculations on hydrogenase kinetics: explanation of the lag phase and the enzyme concentration dependence of the activity of hydrogenase uptake. *Biophys J* **89**, 1957-1964.

### További közlemények

Branca RM, **Bodó G**, Várkonyi Zs, Debreczeny M, Ósz J & Bagyinka Cs (2007) Oxygen and temperature-dependent structural and redox changes in a novel cytochrome c(4) from the purple sulfur photosynthetic bacterium *Thiocapsa roseopersicina*. *Arch Biochem Biophys* **467**, 174-184.

Branca RM, **Bodó G**, Bagyinka Cs & Prókai L (2007) De novo sequencing of a 21-kDa cytochrome c4 from *Thiocapsa roseopersicina* by nanoelectrospray ionization ion-trap and Fourier-



transform ion-cyclotron resonance mass spectrometry. *J Mass Spectrom* **42**, 1569-1582.

Tomčová I, Branca RM, Bodó G, Bagyinka Cs & Smatanová IK (2006) Cross-crystallization method used for the crystallization and preliminary diffraction analysis of a novel di-haem cytochrome c<sub>4</sub>. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **62**, 820-824.

## Konferenciák

### *Előadások*

Cytochrome c<sub>4</sub> from *Thiocapsa roseopersicina*

Rui M Branca, **Gabriella Bodó**, Zsuzsanna Várkonyi, Judit Ősz, Mónika Debreczeny, Csaba Bagyinka

*8<sup>th</sup> International Conference on Membrane Redox Systems 2006, Szeged, Hungary*

Protein-protein interaction during autocatalytic reaction cycle of hydrogenase enzyme from purple photosynthetic bacteria *Thiocapsa roseopersicina*

**Gabriella Bodó**, Judit Ősz, Csaba Bagyinka

*Dynamics Days 2003, Palma de Mallorca, Spain*

Experimental and theoretical evidence for the autocatalytic reaction cycle of hydrogenase enzyme from *Thiocapsa roseopersicina*

Judit Ősz, **Gabriella Bodó**, Csaba Bagyinka

*Dynamics Days 2003, Palma de Mallorca, Spain*

### ***Poszterek***

Autocatalytic reaction of hydrogenase from *Thiocapsa roseopersicina*

**Gabriella Pankotai-Bodó**, Rui M Branca, Ágota Tóth, Dezső Horváth, Csaba Bagyinka

*33<sup>rd</sup> FEBS Congress - 11<sup>th</sup> IUBMB Conference 2008, Athens, GREECE*

(2008) *Febs Journal* **275**, 204-204.

The autocatalytic reaction cycle of hydrogenase: evidences, models and possible physiological importance

**Gabriella Pankotai-Bodó**, Rui M Branca, Ágota Tóth, Dezső Horváth, Csaba Bagyinka

2008 Gordon Research Conference on *Oscillations & Dynamic Instabilities in Chemical Systems*, Waterville, ME, USA

The autocatalytic reaction of hydrogenase enzyme

Judit Ósz, **Gabriella Bodó**, Rui M. Branca, Csaba Bagyinka

*30<sup>th</sup> FEBS Congress - 9<sup>th</sup> IUBMB Conference 2005, Budapest, Hungary*

(2005) *Febs Journal* **272**, 257-258.

## **Köszönetnyilvánítás**

Szeretném köszönetemet kifejezni

témavezetőmnek

Dr. Bagyinka Csabának,

az általa vezetett csoport tagjainak,

Dr. Ósz Juditnak és Dr. Rui Miguel Mamede Branca-nak,

Dr. Tóth Ágotának és Dr. Horváth Dezsőnek,

Verebélyné Rózsának,

Prof. Dr. Dékány Imrének a Kolloidkémiai Tanszék vezetőjének, és

Dr. Majzik Andreának,

a Dr. Ormos Pál vezette MTA SZBK Biofizikai Intézet dolgozóinak,

a Dr. Kovács Kornél vezette hidrogénáz csoport tagjainak.

Végezetül, de nem utolsósorban köszönetet mondok édesanyámnak,

aki tanulmányaimat lehetővé tette,

és a családom összes tagjának.