

Egy új típusú szulfid kinon oxidoreduktáz funkcionális és működési analízise

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Duzs Ágnes

Témavezetők:

Dr. Tóth András, tudományos munkatárs

Dr. Rákhely Gábor, tanszékvezető, egyetemi docens

Biológia Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Kar
Biotechnológiai Tanszék, Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai
Kutatóközpont Biofizikai Intézet

Szeged

2018

BEVEZETÉS

A kén minden sejt számára esszenciális elem. Szerves vagy szervetlen vegyületei gáz, folyadék és szilárd halmazállapotban is elterjedtek. Legredukáltabb formája a szulfid, mely az „ősleves” fontos alkotórésze volt. Az élőlények számára bizonyos koncentráció felett toxikus azáltal, hogy a légzési láncot gátolja. Azonban ismert toxicitása ellenére számos fiziológiai funkciót lát el mind prokarióták, mind eukarióták életében. Emlősöknél fontos szerepet tölt be a központi idegrendszerben, kardiovaszkuláris rendszerben, angiogenezisben, izomtónus szabályozásában. Prokarióták esetén elektron donorként szolgál számos fototróf mikroorganizmusnak. A szulfid detoxifikálásában, homeosztázisának fenntartásában illetve elektron donorként való felhasználásában a szulfid oxidáló enzimek vesznek részt. Ilyen enzimek a flavocitokróm c szulfid dehidrogenáz (FCSD) illetve a szulfid kinon oxidoredukázok (SQR) amelyek az ősi diszulfid reduktáz fehérje család flavoproteinjei. Fontosságukat bizonyítja széleskörű elterjedésük az élőlényekben. Az SQR fehérjék a növények kivételével minden fejlődési ágon megtalálhatóak, azonban diverzitásuk ellenére szerkezetüket tekintve nagyon konzervált enzimek. Az SQR enzimek csoportosítása filogenetikai kapcsolatuk, konzervált szekvencia motívumok és aminosavak meglétén vagy hiányán alapul, mely szerint 6 típusukat lehet megkülönböztetni. Közös jellemzőjük az aktív centrumban található FAD kofaktor, továbbá a katalízisben esszenciálisan részt vevő ciszteinek, melyek a csoportok között eltérhetnek. Az enzim működésével a szulfid oxidáció során keletkező elektronokat a membrán kinonraktárába juttatja. Az SQR típusú fehérjék szerkezetéről, működési mechanizmusáról kevés adat áll rendelkezésünkre. A legrészletesebben jellemzett csoport az I. típus, a VI. csoport kevésbé vizsgált, míg a IV. nem rendelkezik jellemzett képviselővel. Számos esetben előfordul, hogy egy mikroorganizmus több, különböző csoportba tartozó SQR enzimmel is rendelkezik. Kutatásaim során céлом volt a szulfid kinon oxidoredukáz enzimekre vonatkozó ismeretek szélesítése egy VI. típusú SQR enzim biokémiai jellemzőinek átfogó megismerése, működésének megértése útján.

ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

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

A *T. roseopersicina* genom átvizsgálását *in silico* módszerekkel, az azonosított gének (*sqrD*, *sqrF*) termékeinek besorolását többszörös szekvencia illesztéssel illetve filogenetikai analízissel végeztem.

A *T. roseopersicina*-ban lévő SqrD és SqrF fehérjék kénanyagcserében betöltött szerepének megismerése céljából a fehérjéket tartalmazó illetve nem tartalmazó kultúrák *in vivo* szulfid felhasználását vizsgáltam gázkromatográffal. Továbbá az anyagcserében való részvételüket az egyes SQR enzimekben mutáns törzsekből izolált membrán frakciók vad típusú sejtek mintáival való összevetésével támasztottam alá szulfid függő kinon redukáló aktivitásuk spektrofotometriás mérsének útján.

A *T. roseopersicina* SqrD és SqrF fehérjéket StrepII affinitás peptiddel ellátva heterológ (*E. coli*) és homológ gazdában (*T. roseopersicina*) expresszáltam. A rekombináns SqrF fehérjét *T. roseopersicina* membrán frakcióból szolubilizálást követően affinitás kromatográfiával tisztítottam.

A tisztított SqrF fehérje analitikai vizsgálatait denaturáló illetve natív grádiens gélelektroforézissel végeztem. A rekombináns fehérjék specifikus detektálását Western-blot hibridizációval végeztem StrepII peptid elleni antitest alkalmazásával.

Az SqrF és FAD kofaktora közötti kovalens kapcsolatot a fehérje denaturáló gélelektroforézisét követően az SqrF fehérje sáv fluoreszcenciájának kimutatásával

igazoltam, amit alátámasztottam az SqrF FAD tartalmának fehérje denaturációval való felszabadíthatóságának spektrofotometriális nyomon követésével.

A tisztított SqrF fehérje redox-aktív FAD kofaktor tartalmát abszorbancia és fluoreszcens spektrofotométerrel igazoltam. Az enzim szulfid függő kinon redukáló aktivitását UV-Vis spektrofotométer segítségével vizsgáltam.

Az SqrF enzim kinetikai állandóit enzimaktivitás értékekre történő nem lineáris regressziós illesztéssel, Matlab programmal határoztam meg.

Az SqrF fehérjében található ciszteinek szerepét irányított mutagenézissel létrehozott cisztein mutáns fehérje variánsok biokémiai analízisével tanulmányoztam. Továbbá szulfhidril csoportokhoz irreverzibilisen kötődő ágensekkel vizsgáltam a vad típusú és mutáns enzimváltozatok gátolhatóságát.

AZ ÉRTEKEZÉS EREDMÉNYEI

Kutatásom során a fototróf bíbor kénbaktérium *Thiocapsa roseopersicina* genomjának átvizsgálása során azonosítottam két SQR fehérjét kódoló gént: *sqrD* és *sqrF*. Levezethető termékeik a szulfid kinon oxidoreduktázok IV. (SqrD) és VI. (SqrF) típusába sorolhatóak, melyek a legkevésbé ismert csoportok az SQR fehérjék között.

- I. Különböző koncentrációjú szulfiddal kezelt *T. roseopersicina* sejtekkel végzett génexpressziós vizsgálatokkal igazoltam, hogy az *sqrD* és *sqrF* gének promótere szulfiddal indukálható. Az *sqrD* 1mM, az *sqrF* gén 2,5 mM Na₂S koncentrációnál érte el a maximális génkifejeződést.
- II. Az SqrD és SqrF fehérjéknek fiziológiai, a kénanyagcserében betöltött szerepük bizonyítása céljából előállítottam az egyes SQR fehérjékben mutáns *T. roseopersicina* törzseket.
- III. Igazoltam, hogy mindkét fehérje a *T. roseopersicina* összetett kénanyagcseréjének résztvevője, hiszen a sejtek az SqrD és az SqrF enzim hiányában is lassabban hasznosították az elektron donorként szolgáló szulfidot.
- IV. Mindkét SQR fehérjét rekombináns módon - C- vagy N-terminálison StrepII affinitás peptiddel fúzionáltatva - expresszáltattam *E. coli*-ban, azonban a képződő rekombináns fehérjék az oldhatatlan csapadék frakcióban voltak. A *T. roseopersicina*-ban termeltetett fehérjét a membrán frakcióban detektáltam.
- V. Az SQR fehérjék membrán-kötöttek, ezért kidolgoztam a membránhoz kapcsolt SqrD és SqrF fehérjék tisztítására alkalmazható tisztítási protokollt. Az SqrD fehérjét nem, de az SqrF fehérjét sikeresen felszabadítottam a sejtmembrán mintákból és affinitás kromatográfiával tisztítottam.
- VI. Meghatároztam natív grádiens gélen végzett western analízis segítségével, hogy az SqrF fehérje mono- di- és trimer formát is felvesz.
- VII. A tisztított SqrF fehérje abszorbancia spektruma és fluoreszcenciája alapján igazoltam FAD kofaktor tartalmát, melyről bebizonyítottam, hogy redox aktív és kovalensen kötött a fehérjéhez.

- VIII. Kimutattam, hogy az SqrF enzim szulfid függő kinon redukciót katalizál, ehhez elektron akceptorként csak kinon molekulákat képes elfogadni. Kinon preferencia vizsgálat alapján igazoltam, hogy az enzim ubikinon típusú kinonokat (decilubikonin, durokinon) részesít előnyben.
- IX. Durokinon és decilubikinon alkalmazása mellett megvizsgáltam az enzim katalitikus tulajdonságait: Meghatároztam az enzimaktivitás pH- és hőmérséklet függését. A különböző hőmérsékleten mért aktivitás adatokból kiszámoltam az SqrF enzim aktivációs energiáját. Az enzim aktivitásának szulfid és ko-szubsztrátok koncentrációjától való függése alapján meghatároztam az enzimkinetikai állandókat. Az SqrF enzim esetében megmért paraméterek alapján a VI. típusú szulfid kinon oxidoreduktázok katalitikus jellemzői eltérőek más csoportba tartozó SQR enzimek tulajdonságaitól.
- X. Megvizsgáltam az SqrF enzim hőstabilitását, mely alapján elmondható, hogy az SqrF egy mérsékelt hőstabil fehérje.
- XI. A *T. roseopersicina* SqrF fehérjében három konzervált (C121, C272, C332) és egy (C49) csak erre a VI. típusú SQR fehérjére jellemző ciszteint azonosítottam. A fehérje működésében való szerepük vizsgálata érdekében előállítottam az egyes ciszteinekben mutáns fehérjéket termelő *T. roseopersicina* törzseket, melyekből kitisztítottam a cisztein pontmutáns fehérje variánsokat.
- XII. Abszorbancia spektrumuk alapján megállapítottam, hogy a C121A mutáns kivételével a variánsok FAD kofaktort tartalmaznak.
- XIII. A C121A enzim kivételével a mutáns enzimek szulfid függő kinon redukáló aktivitását megmértem és meghatároztam a variánsok kinetikai paramétereit. A kiszámolt paraméterek alapján arra következtettem, hogy a C272 az enzimreakció reduktív felében játszat szerepet. Továbbá, hogy a 332. ciszteinnek fontos szerepe van az enzim működésében, habár nem esszenciális, feltehetőleg a reakcióciklusok során keletkező oxidált kéntermék koordinálásában vesz részt.
- XIV. Bizonyítottam a ciszteinek kiemelkedő szerepét a katalízisben azáltal is, hogy szulfhidril csoportokkal irreverzibilisen kapcsolódó ágensekkel (jódacetamid, jódecetsav) sikerült gátolnom a vad típusú és a cisztein pontmutáns enzimek aktivitását.

- XV. Igazoltam, hogy a C121 több szempontból is elengedhetetlen az enzim működéséhez, mivel a FAD kötés mellett a szulfid oxidációban is fontos szerepet játszik. Mindez bizonyítja, hogy a katalízis és a FAD kofaktor kötés szoros összefüggésben állnak a VI. típusú szulfid kinon oxidoreduktázok esetében.
- XVI. Felállítottam egy lehetséges modellt az SqrF enzim működésére vonatkozóan.

TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK

A dolgozat alapját képező közlemények:

1) **Ágnes Duzs**, András Tóth, Brigitta Németh, Timea Balogh, Péter B. Kós, Gábor Rákhely: A novel enzyme of Type VI sulfide:quinone oxidoreductases in purple sulfur photosynthetic bacteria, *Applied Microbiology and Biotechnology*, (2018) *elfogadva, megjelenés alatt* **IF: 3,42**

A dolgozat alapjául nem szolgáló, de hozzá szorosan kapcsolódó közlemények:

2) Csaba I. Nagy, Imre Vass, Gábor Rákhely, István Zoltán Vass, András Tóth, **Ágnes Duzs**, Loredana Peca, Jerzy Kruk, Péter B. Kós: Coregulated Gene Link Sulfide:Quinone Oxidoreductase and Arsenic Metabolism in *Synechocystis* sp. Strain, *Journal of Bacteriology*, (2014) 196: 3430-3440 **IF: 2,808**

Egyéb közlemények:

3) **Ágnes Duzs**, András Tóth, Paula Dobrotka, András Dobos, Kornél L. Kovács, Gábor Rákhely. Sulfide oxidation in a purple sulfur photosynthetic bacterium, *Thiocapsa roseopersicina* BBS. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 60:(supp1) p. 17. (2013)

4) **Duzs Ágnes**, Témavezetők: Tóth András, Rákhely Gábor. Kénanyagcserében részt vevő szulfid-oxidáló enzimek jellemzése egy fotoszintetikus bíbor kénbaktériumban. XXX. Országos Tudományos Diákköri Konferencia Budapest 2011.

5) **Duzs Ágnes**, Tóth András, Dobrotka Paula, Dobos András, Kovács L. Kornél, Rákhely Gábor. Szulfid oxidáció egy fotoszintetikus bíbor kénbaktériumban. Magyar Mikrobiológiai Társaság 2012. évi Nagygyűlése, 2012.

- 6) **Duzs Ágnes**, Tóth András, Kiss Enikő, Németh Brigitta, Rákhely Gábor. Szulfid oxidáló enzimek egy fototróf bíbor kénbaktériumban. Tavaszi Szél 2014, Debrecen 2014.
- 7) **Duzs Ágnes**. Szulfid-oxidáz enzimek egy fototróf bíbor kénbaktériumban. Szegedi Biológus Doktorandusz Konferencia 2014, Szeged 2014.
- 8) András Tóth, **Ágnes Duzs**, Enikő Kiss, Brigitta Németh, Kornél L. Kovács, Gábor Rákhely. Sulfide oxidase enzymes in photosynthetic purple sulfur bacteria. 4th Central European Forum for Microbiology, Keszthely 2013.
- 9) András Tóth, **Ágnes Duzs**, Enikő Kiss, Brigitta Németh, Gábor Rákhely. Biochemical and functional analysis of sulfide oxidase enzymes in purple sulfur bacteria. 1. Biomedica Minikonferencia, Szeged 2013.
- 10) Enikő Kiss, András Tóth, **Ágnes Duzs**, Brigitta Németh, Gábor Rákhely. Biochemical and functional analysis of the Flavocytochrome c in a photosynthetic purple sulfur bacterium. I. Innováció a Természettudományban, Szeged 2014.
- 11) **Ágnes Duzs**, András Tóth, Brigitta Németh, Vivien Tejsi, Timea Balogh, Gábor Rákhely. Catalytic properties of a type VI sulfide quinone oxidoreductase Microbial Sulfur Metabolism international conference, Helsingor, Denmark 2015.
- 12) **Ágnes Duzs**, András Tóth, Kornél L. Kovács, Gábor Rákhely. Identification and characterization of the flavocytochrome c sulfide oxidase in a purple sulfur photosynthetic bacterium. ISIRR 2010 11th International Symposium Interdisciplinary Regional Research Szeged 2010.
- 13) Timea Balogh, **Ágnes Duzs**, Enikő Kiss, András Tóth, Gábor Rákhely. Expression analysis of sulfide oxidizing enzymes and characterization of flavocytochrome-c sulfide

dehydrogenase in a purple sulfur photosynthetic bacterium. Microbial Sulfur Metabolism international conference, Helsingor, Denmark 2015.

14) András Tóth, **Ágnes Duzs**, Timea Balogh, Brigitta Németh, Enikő Kiss, Gábor Rákhely. Biochemical and functional analysis of sulfide oxidase flavoproteins from purple sulfur bacterium, *Thiocapsa roseopersicina*, Microbial Sulfur Metabolism international conference, Helsingor, Denmark 2015.

15) András Tóth, **Ágnes Duzs**, Roland Tengölics, Kornél L. Kovács, Gábor Rákhely. Sulfide oxidase enzymes in the photosynthetic purple sulfur bacterium, *Thiocapsa roseopersicina* 7th European Workshop on Bacterial Respiratory Chains Backgården 2011.

16) András Tóth, Roland Tengölics, **Ágnes Duzs**, Kornél L. Kovács, Gábor Rákhely. Reduced sulfur compounds as electron sources of photobiological hydrogen production in *Thiocapsa roseopersicina*. SOLAR-H2 Workshop 2011, Uppsala 2011..

17) Roland Tengölics, Edit Győri, Lívia Mészáros, Zsolt Doffkay, András Tóth, **Ágnes Duzs**, Kornél, L. Kovács, Gábor Rákhely. Connection between sulfur metabolism and Hyn hydrogenase of *Thiocapsa roseopersicina*. EMBO Workshop on Microbial Sulfur Metabolism, Leeuvenhorst Hollandia 2012.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom mindenkinek, aki segített abban, hogy ez a munka elkészülhessen.

Különösen hálás vagyok témavezetőimnek és **Dr. Tóth Andrásnak** és **Dr. Rákhely Gábornak**, hogy vállalták a szakmai irányításomat, ezáltal elindítottak a kutatói pályán.

Köszönöm az hosszú éveken át tartó türelmüket, iránymutatásukat és önzetlen segítségüket.

Köszönöm **Prof. Dr. Kovács Kornélnak**, hogy a kezdetekkor biztosította, hogy elkezdhessem kutatásaimat a Biotechnológiai Tanszéken. Hálás köszönöm neki továbbá, hogy a hosszú évek alatt mindig számíthattam a szemináriumokon értékes tanácsaira, szakmai észrevételeire.

Köszönöm **Katonáné Lehoczky Klárának**, hogy bevezetett a „labor-életbe” valamint **Verebély Rózsának** és **Bettynek** a barátságukat és a technikai segítséget.

Köszönöm szakdolgozóink (**Paula, Bandi, Enikő, Brigi, Vivi, Adri, Niki, Timi, Fanni**) szorgalmas munkáját, akikkel mindig élvezetes volt a csapatmunka.

Továbbá köszönettel tartozom az **SZTE Biotechnológiai Tanszék** és az **MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont Biofizikai Intézet** minden jelenlegi és volt dolgozójának a munkám sikeréhez való hozzájárulásukért.

Köszönettel tartozom a **Magyar Tudományos Akadémia, Szegedi Biológiai Kutatóközpont Biofizikai Intézetének**, hogy Fialtal Kutatói ösztöndíjjal támogatott.

Végül, de nem utolsó sorban mérhetetlen hálát érzek a **Családom** és **Barátaim** iránt, akik támogatása nélkül nem tarthatnék itt.