A hidrogenáz enzim autokatalitikus működésének vizsgálata

Ph.D. dolgozat

Pankotai-Bodó Gabriella

Témavezető:

Dr. Bagyinka Csaba

MTA Szegedi Biológiai Központ, Biofizikai Intézet

Szeged

2009

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke3				
Beveze	etés	4		
1. Ire	odalmi áttekintés	5		
1.1.	A hidrogenázok előfordulása, funkciója és sejten belüli elhelyezkedése	5		
1.2.	A hidrogenázok csoportosítása	6		
1.3.	A hidrogenázok szerkezete	7		
1.3.1.	A [NiFe] hidrogenázok szerkezete	7		
1.3.2.	A [FeFe] hidrogenázok szerkezete	10		
1.4.	A hidrogenázok működése	11		
1.4.1.	Aktiválás	12		
1.4.2.	Enzim modellek	13		
1.4.3.	Hidrogenáz aktivitás mérésére szolgáló módszerek	15		
1.5.	Hidrogenázok bioszintézise és érése	17		
1.5.1.	Membrán targeting és transzlokáció	19		
1.6.	A Thiocapsa roseopersicina jellemzése és hidrogenázai			
1.6.1.	A stabil HynSL hidrogenáz			
1.7.	Az autokatalízis			
1.7.1.	Autokatalízis a kémiában	25		
1.7.2.	Autokatalízis a biológiában	27		
1.7.3.	Autokatalízis a Hyn működése során			
1.8.	A sók Hofmeister sorozata	30		
2. Ce	élkitűzések			
3. Ai	nyagok és módszerek			
3.1.	A Thiocapsa roseopersicina tenyésztése			
3.2.	A stabil hidrogenáz tisztítása			
3.3.	Módosítatlan fehérjék fény által indukált keresztkötése (PICUP)			
3.4.	Dinamikus fényszóródás (DLS) mérések			
3.5.	Vékonyréteg kísérletek			
3.5.1.	A frontsebesség függése az enzim koncentrációtól			
3.5.2.	A frontsebesség függése az elektron akceptor koncentrációtól			
3.5.3.	A frontsebesség függése a hidrogén koncentrációtól			
3.5.4.	A frontsebesség függése a hidrogénion koncentrációtól (pH)			

3.5.5	. Oszcilláló reakciók				
3.5.6	. Vékonyréteg kísérlet gélben				
3.5.7	. Vékonyréteg kísérletek különböző sók jelenlétében	40			
3.6.	Modellszámítások	41			
4. I	Eredmények				
4.1.	A vékonyréteg kísérleti rendszer				
4.2.	A prion típusú autokatalízist igazoló kísérletek				
4.2.1	A frontsebesség függése az enzim koncentrációjától				
4.2.2.	. Fehérje keresztkötési kísérletek (PICUP)				
4.2.3	. Konformáció változás vizsgálata dinamikus fényszórással (DLS)				
4.2.4	. Különböző Hofmeister sorozatbeli sók hatása a frontsebességre				
4.3.	A reakció mintázatot befolyásoló körülmények vizsgálata	50			
4.3.1	A frontsebesség függése az elektron akceptor koncentrációtól				
4.3.2	A frontsebesség függése a hidrogén koncentrációtól	51			
4.3.3	A frontsebesség függése a hidrogénion koncentrációtól (pH)				
4.3.4	Kísérletek gélfázisban	53			
4.4.	Oszcilláció	53			
4.5.	Modellszámolások	56			
4.5.1	. 1. modell (autokatalitikus lépés az enzimcikluson belül)	57			
4.5.2	. 2. modell (autokatalitikus lépés az enzimcikluson kívül)	59			
5. /	Az eredmények megvitatása	62			
6. I	rodalomjegyzék	68			
7. 0	Összefoglalás77				
8. 5	Summary				
Kösz	önetnyilvánítás				

Rövidítések jegyzéke

APS - ammónium-perszulfát

- ATP adenozin-trifoszfát
- BSE szivacsos agyvelőgyulladás (bovine spongiform encephalopathy)
- CJD Creutzfeldt Jakob-kór (Creutzfeldt Jakob disease)
- CSTR folyamatosan kevert tankreaktor (continuously stirred tank reactor)
- DEAE dietil-aminoetil cellulóz (diethylaminoethyl cellulose)
- DCIP 2,6-dikloro-indofenol (2,6-dichloro-indophenol)
- DFT molekuladinamikai számolások (density functional theory)
- DLS dinamikus fényszóródás (dynamic light scattering)
- ENDOR electron-nuclear double resonance (spectroscopy)
- EPR electron paramagnetic resonance (spectroscopy)
- ESEEM electron spin-echo envelope modulation (spectroscopy)
- EXAFS extended X-ray absorption fine structure (spectroscopy)
- FPLC fast protein liquid chromatography
- FTIR Fourier transform infrared (spectroscopy)
- GTP guanozin-trifoszfát
- Hmd H2-forming methylentetrahydromethanopterin dehydrogenase
- MES 2-morfolin-etán-szulfonsav

NADH, NADPH - redukált nikotinamid-adenin-dinukleotid, nikotinamid-adenin-dinukleotidfoszfát

- ORF nyitott olvasási keret (open reading frame)
- PAGE poliakrilamid gélelektroforézis (polyacrylamide gelelectrophoresis)
- PICUP photo-induced cross-linking of unmodified proteins
- PCS photo-correlation spectroscopy
- QELS quasi-elastic light scattering
- SDS nátrium-dodecil szulfát
- Tat twin arginin transport
- TCD thermal conductivity detector
- Tris tris-(hidroxi-metil)-amino-metán

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 előállítási lehetőségek kutatásának fontosságát a kifogyóban lévő kőolaj és földgáz készletek is indokolják és a hidrogén igen "környezetbarát" energiahordozó, oxidációjakor csak víz keletkezik. A biotechnológiai alkalmazásokban ugyanakkor a 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 tudni kell, 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 magyarázták.

1. Irodalmi áttekintés

1.1. A hidrogenázok előfordulása, funkciója és sejten belüli elhelyezkedése

A hidrogenázok a molekuláris hidrogén reverzibilis oxidációját és redukcióját katalizáló enzimek:

$$H_2 \rightleftharpoons 2 H^+ + 2 e^-$$

Elsősorban anaerob és aerob *Archea* mikroorganizmusokban, baktériumokban fordulnak elő, de eukariótákban is találtak már hidrogenázokat [Mazet 2008]. Eukariótákban a hidrogenázok elkülönült sejtorganellumban, az úgynevezett hidrogenoszómában, míg prokariótákban szabadon, a citoplazmában, a periplazmában vagy membránhoz asszociáltan helyezkednek el. Egy mikroorganizmus több hidrogenázzal is rendelkezhet, melyek elhelyezkedésükben és funkciójukban is eltérhetnek egymástól [Cammack és mtsai 2001]. A hidrogenázok *in vitro* mindkét (hidrogén fejlesztő és hidrogén felvevő) irányba képesek katalizálni a reakciót, azonban egy adott hidrogenáz *in vivo* a sejtben általában csak az egyik irányban működik a mikroorganizmus igényeinek megfelelően.

A hidrogén felvevő irány az energia konzerváló reakciókhoz kapcsolódik (pl.: NAD(P)H képzés, metántermelés), a hidrogén fejlesztő irány pedig a felesleges redukáló potenciálok megszüntetéséhez. A hidrogenázok fiziológiai funkcióját tekintve általánosan elmondható, hogy központi szerepet játszanak a mikrobiális energia metabolizmusban, a hidrogén termelésének és hasznosításának a kulcsenzimei. Leggyakrabban előforduló jellemző funkcióik a következők:

- a hidrogén molekula oxidációja, ami kapcsolódhat különböző elektron akceptorok redukciójához, például nitrát, szulfát, fumarát, szén-dioxid,
- proton redukciója (hidrogén molekula képzése), amely például a piruvát fermentációs folyamatában fontos,
- kémiai energia átalakítása bioenergetikai folyamatokban azáltal, hogy a citoplazmatikus és periplazmatikus redukció és oxidáció során protongradiens alakul ki a biológiai membrán két oldala között, melyet a mikroorganizmus makroerg foszfát kötés kialakítására használ föl, és metabolikus folyamataiban hasznosíthat [Kovács és mtsai 1990, Przybyla és mtsai 1992].

A hidrogenázok fémtartalmú fehérjék, többségük a vas-kén kockák mellett az aktív helyen egy nikkelt és egy vas atomot ([NiFe] hidrogenázok) vagy két vas atomot ([FeFe] hidrogenázok) tartalmaz. A [NiFe] hidrogenázok aerob és anaerob prokariótákban és archeákban, a [FeFe] hidrogenázok obligát anaerob prokariótákban, archeákban, *Clostridium* fajokban és szulfát redukálókban illetve alacsonyabbrendű eukariótákban fordulnak elő. A [NiFe] hidrogenázok a sejtben főként energia konzerváló irányban működnek, míg a [FeFe] hidrogenázokra a hidrogén termelés jellemző (kivételek természetesen előfordulnak).

Metanogén archeákban egy más típusú hidrogenázt fedeztek fel és fémet nem tartalmazó hidrogenáznak nevezték el őket [Zirngibl és mtsai 1992], mivel sem nikkelt, sem vas-kén kockákat nem találtak bennük. A jelenlegi kutatások szerint azonban működésükhöz elengedhetetlen egy vas tartalmú kofaktor, így újabban vas-kén kocka nélküli (iron-sulfur cluster free hydrogenase) vagy [Fe] hidrogenázoknak nevezik őket [Zirngibl és mtsai 1992, Thauer és mtsai 1996, Lyon és mtsai 2004, Korbas és mtsai 2006]. Ezek a H₂-képző metiléntetrahidrometanopterin dehidrogenázok (Hmd), melyek szintézise megnő nikkel hiányos körülmények között és a metanogenezisben részt vevő egyik [NiFe] hidrogenázt helyettesítik. A Hmd enzimek fehérje szerkezetükben és működésükben is különböznek a [NiFe] és [FeFe] hidrogenázoktól, de a vas atomot koordináló ligandjaik mégis hasonlóságot mutatnak a NiFe és FeFe aktív centrum vas atomjának ligandjaival [Shima és mtsai 2008]. Az aktivitásukhoz szükséges Fe atom nem redox aktív és nem katalizálják a molekuláris hidrogén reverzibilis oxidációját. A *Methanothermobacter marburgiensis* Hmd hidrogenáza két 38 kDa-os alegységből álló és kettő vas atomot tartalmazó homodimer.

A továbbiakban a [NiFe] és [FeFe] hidrogenázokat jellemzem bővebben.

1.2. A hidrogenázok csoportosítása

A hidrogenázok csoportosíthatóak az aktív centrum fémtartalma alapján ([NiFe]-, [FeFe]-, [Fe] hidrogenázok). A [NiFe] hidrogenázokhoz sorolják még a [NiFeSe] hidrogenázokat is, ahol a Ni atomot koordináló egyik cisztein helyett szeleno-cisztein van. Az aminosav szekvencia és szerkezeti összehasonlítások alapján elmondható, hogy a [NiFe]-, [FeFe]-, és [Fe] hidrogenázok egymástól filogenetikailag is elkülönülő csoportot alkotnak [Vignais és mtsai 2001].

Az első osztályozás a [NiFe] hidrogenázokat négy osztályba sorolta. Az ismert szekvenciák számának növekedésével újabb felosztást javasoltak [Wu és mtsai 1993,

Vignais és mtsai 2001]. A nagy alegységek szekvencia összehasonlítása során két igen konzervált régiót találtak az aktív helyet koordináló két cisztein ligand körül, közel a C-illetve az N-terminálishoz (L1 és L2 mintázat). A [NiFe] hidrogenázok ezen mintázatok alapján történő csoportosítása összhangban van azok celluláris funkció és teljes szekvencia hasonlóság szerinti felosztásukkal is:

1. csoport	_	membrán asszociált légzési uptake [NiFe] hidrogenázok
2. csoport	_	a. cianobakteriális uptake hidrogenázok b. H2 érzékelő hidrogenázok
3. csoport	_	 a. F₄₂₀-redukáló hidrogenázok b. bifunkcionális hipertermofil hidrogenázok c. metil viologén redukáló hidrogenázok d. kétirányú NAD-dal kapcsolt hidrogenázok
4. csoport	_	membrán kötött H_2 fejlesztő hidrogenázok.

1.3. A hidrogenázok szerkezete

A hidrogenázok alegységeik számát és méretét tekintve a filogenetikailag egy csoportba tartozó hidrogenázok hasonlóak. Az alapvető egységek, melyek szükségesek a működésükhöz a katalitikus centrum, ahol feltehetőleg a hidrogén hasítása történik és az elektronszállításban szerepet játszó vas-kén kockák.

1.3.1. A [NiFe] hidrogenázok szerkezete

A [NiFe] hidrogenázok általában heterodimer fehérjék, a nagy alegység 60 kDa, a kis alegység 30 kDa körüli molekulasúllyal rendelkezik. A több alegységes komplexekben is egy hasonló heterodimer fehérje alkomplex található, amely a hidrogenáz aktivitásért felelős. A *Desulfovibrio gigas* szolubilis [NiFe] hidrogenázának, a *Desulfovibrio vulgaris* [NiFe] hidrogenázának és a *Desulfovibrio fructosovorans* [NiFe] hidrogenázának kristályszerkezete ismert, ezeket tekintik a [NiFe] hidrogenázok szerkezeti alapmodelljének [Volbeda és mtsai 1995, Volbeda és mtsai 2005].

A *Desulfovibrio gigas* szolubilis [NiFe] hidrogenáza egy kb. 3 nm sugarú, globuláris heterodimer fehérje (1. ábra). A fehérje a periplazmában helyezkedik el, kis

alegysége 28 kDa, nagy alegysége 60 kDa. A két alegység nagy felületen hat kölcsön egymással. A nagy alegységen található a két fématomot tartalmazó katalitikus centrum, amely négy cisztein tiolát kötése révén kapcsolódik a fehérjéhez (2. ábra b). A kis alegység kettő [4Fe-4S] kockát és egy [3Fe-4S] kockát tartalmaz, melyek majdnem egy egyenes mentén, egymástól kb. 1,2 nm-re helyezkednek el.





[NiFe] hidrogenázok általános szerkezete, ami a *D. gigas* periplazmatikus [NiFe] hidrogenázának szerkezete alapján készült [Szilágyi és mtsai 2002]. A nagy alegység (L) mélyén található a NiFe centrum, a kis alegység (S) a vas-kén kockákat (Fe-S) tartalmazza.

Az aktív centrumban a Ni a fehérjéhez két cisztein, a Fe atomhoz további két cisztein aminosavon keresztül kapcsolódik. A Fe atomnak két CN⁻ és egy CO ligandja van, amiket infravörös spektroszkópiával (FTIR) és kémiai analízissel sikerült azonosítani [Pierik és mtsai 1999]. Feltételezések szerint oxidált állapotban egy μ-oxo, vagy hidroxo ligand köti össze a két fématomot, redukált állapotban ez a ligand hiányzik a két fématom között [Lamle és mtsai 2004, Volbeda és mtsai 2005, Ogata és mtsai 2005]. Az aktív helyhez közeli [4Fe-4S] kockát proximális, a legtávolabbit disztális és a kettő között lévő [3Fe-4S] kockát mediális vas-kén kockának nevezik. A kis alegység N terminális szekvenciája, amely a proximális vas-kén kockát köti, a [NiFe] hidrogenázoknál konzervált, míg a többi vas-kén kockát kötő C terminális rész szekvenciája változó. A FeS kockák elhelyezkedése és spektroszkópiai mérések is azt sugallják, hogy az aktív hely és a felszín közötti elektron transzferben van szerepük. A proximális vas-kén kocka egy hisztidin ligandjának imidazol gyűrűje pedig közvetlen kapcsolatban van a molekulát körülvevő oldószerrel. A mediális vas-kén kocka szerepe

az elektronszállításban magas redox potenciálja miatt még kérdéses. Ugyanakkor szerepe lehet az enzimre káros szuperoxid kevésbé ártalmas peroxiddá redukálásában [Albracht és mtsai 1994]. Szuperoxid a redukált Ni és oxigén reagálásakor keletkezhet az aktív helyen. *Desulfovibrio vulgaris*-ban ezt a [3Fe-4S] kockát mutagenezissel [4Fe-4S] kockává alakították és az enzimatikus aktivitás nem változott, de az enzim sokkal érzékenyebb lett oxigénre [Rousset és mtsai 1998].



2. ábra

A hidrogenázok aktív centruma [Armstrong 2004]. A [FeFe] hidrogenázok aktív centruma (a) az ún. H-klaszter, amit két Fe atom és egy Cys tiolát kötésen keresztül kapcsolódó [4Fe-4S] kocka alkot. A Fe^P a vas-kén kockához közelebbi (proximális), a Fe^D a távolabbi (disztális) vas atomot jelöli. Az L egy kicserélhető ligand (H₂O), az Y valószínűleg egy amino N atom. A [NiFe] hidrogenázok aktív centrumát (b) egy Ni és egy Fe atom alkotja, melyeket Cys aminosavak tiolát kötései koordinálnak. A Ni és Fe atom között (X) oxidált enzim esetében kétatomos oxigén ligand található (oxo vagy hidroxo csoport), redukált enzimnél pedig egy hidrid.

Néhány [NiFe] hidrogenáz képes tolerálni az oxigént működése közben és CO-ra sem érzékeny. Ilyen például a *Ralstonia eutropha* NAD⁺ redukáló hidrogenáza, amelynek aktív centrumában 4 cianid csoport található, ezek közül egy a Ni-hez, három pedig a Fe atomhoz tartozik [Happe és mtsai 2000, Van der Linden és mtsai 2004]. A csökkent oxigén érzékenységért a Ni-hez kapcsolódó cianid csoport felelős.

A katalitikus centrum és a hozzá közel eső proximális FeS kocka mélyen a fehérje felszíne alatt helyezkedik el. A protonok valószínűleg hisztidin és karbonil csoportok, továbbá vízmolekulák segítségével mozognak, az elektronok mozgását a vas-kén kockák biztosítják. A H₂ molekulák hidrofób csatornákon keresztül, diffúzióval jutnak el a katalitikus centrumig illetve a felszínig [Montet és mtsai 1997].

Irodalmi áttekintés

A [NiFe] hidrogenázok aktív centrumának változásai mágneses rezonancia technikákkal (EPR, ENDOR, ESEEM) és FTIR spektroszkópiával vizsgálhatók. EPR technikával a Ni különböző oxidációs állapotai azonosíthatóak: a Ni(I) és Ni(III) paramágneses, EPR aktív forma, a Ni(II) és Ni(IV) diamágneses, EPR csendes forma. FTIR spektroszkópiai mérésekkel fedezték fel a vas kétatomos ligandjait, a két CN⁻ és a CO csoportot [Bagley és mtsai 1995]. Az FTIR technika az EPR csendes állapotok vizsgálatára is alkalmas.

1.3.2. A [FeFe] hidrogenázok szerkezete

A [FeFe] hidrogenázok általában monomer fehérjék és csak a katalitikus alegységet tartalmazzák, bár ismertek több alegységes [FeFe] hidrogenázok is [Vignais és mtsai 2007]. Az aktív helyet tartalmazó katalitikus alegységük mérete változó és körülbelül 350 konzervált aminosav található benne. Aktív helyük az ún. H-klaszter, amely két Fe atomot és egy [4Fe-4S] kockát tartalmaz (2. ábra a). A vas-kén kockához közeli proximális Fe atom egy cisztein tiolátkötése révén kapcsolódik a vas-kén kockához, a másik disztális Fe atom nincs közvetlen kovalens kapcsolatban a fehérjével. A proximális és disztális Fe atom egy közös kén ligandon osztoznak. A disztális Fe atom egy szabad koordinációs hellyel rendelkezik, ahová a kompetitív inhibitor molekula, a CO kötődni képes, ezért ezt gondolják az enzim hidrogénkötő helyének is. Mindkét Fe atomhoz egy CO és egy CN⁻ csoport kapcsolódik, melyek a fehérjével hidrogén kötésben vannak.

Az elektronszállításban részt vevő vas-kén kockák általában további doméneken találhatóak. Az anaerob Gram pozitív *Clostridium pasteurianum* szolubilis, monomer CpI [FeFe] hidrogenáza (3. ábra) a katalitikus domén mellett még három doménnel rendelkezik, melyek két [4Fe-4S], egy [2Fe-2S] és egy 3 Cys és egy szokatlan His ligand által koordinált [4Fe-4S] kockát hordoznak [Peters és mtsai 1998]. Elhelyezkedésük alapján az utóbbi két vas-kén kocka valószínűleg a fiziológiás elektron donorral van kapcsolatban, a maradék kettő [4Fe-4S] kocka pedig az aktív hellyel.

Ezeknél a fehérjéknél is mélyen a felszín alatt helyezkedik el az aktív hely. A proton transzfer a [NiFe] hidrogenázokhoz hasonlóan Glu, Ser aminosavakon és vízmolekulákon keresztül történhet. A H₂ molekulák hidrofób csatornákon jutnak el az aktív helyig.



3. ábra

A Clostridium pasteurianum CpI [FeFe] hidrogenázának szerkezete [Peters és mtsai 1998].

1.4. A hidrogenázok működése

A legtöbb fizikai-kémiai kutatás, amely a hidrogenázok reakció mechanizmusát vizsgálja, [NiFe] hidrogenázokat használ. Ennek egyik oka, hogy a [FeFe] hidrogenázok tisztítása nehézkes, érzékenyebbek az aerob körülményekre. Az általunk használt hidrogenáz [NiFe] típusú aktív centrummal rendelkezik, ezért csak a [NiFe] hidrogenázokról beszélek a továbbiakban. A kutatásban alkalmazott technikák főleg az aktív centrum redox változásait, illetve a Ni atom változásait mérik (EPR, ENDOR, EXAFS). A Fe atom oxidációs állapota valószínűleg nem változik az enzim működése során, mivel Mössbauer spektroszkópiával mindig 2+ oxidációs állapotban detektálták. A Fe atomhoz kapcsolódó CO és CN⁻ ligandok infravörös spektroszkópiával (FTIR) mérhetőek, így az aktív hely elektron szerkezete és az aktív hely környezetének változásai követhetők az EPR csendes állapotokban is. A kísérletes vizsgálatok mellett elterjedt az elméleti módszerek használata (DFT: density functional theory, molekuladinamikai számolások) [Stein és mtsai 2001]. Modell vegyületek tanulmányozásával is hasznos infomációk nyerhetőek az aktív hely szerkezetéről [Li és mtsai 2005, Li-Cheng és mtsai 2008].

A hidrogén kötése és képzése az aktív centrumnál történik. Hidrogén izotóp kicserélődési kísérletekből ismert, hogy a hidrogén hasítása heterolitikus [Krasna és mtsai 1954], vagyis az enzim a hidrogén molekulákat a következő egyenlet szerint köti meg.

$$H_2 + E \rightleftharpoons EH_2 \rightleftharpoons H:E^- + H^-$$

A hidrogén molekulák illetve valószínűleg a protonok is speciális csatornákon át jutnak el a mélyen fekvő katalitikus centrumig. Az elektronok szállításában a vas-kén kockák vesznek részt. A disztális vas-kén kocka ezenkívül kölcsönhatásba lép az elektron donor illetve elektron akceptor molekulával is. A katalitikus ciklust illetően számos modell született már, melyek főként a fém centrumok különböző oxidációs állapotaira épülnek, ezekről a továbbiakban beszélek részletesen.

1.4.1. Aktiválás

Régóta ismert, hogy a [NiFe] hidrogenázok aerob körülmények között inaktívak és aktiválás szükséges hatékony működésükhöz (redukció, általában H₂ alatti inkubálás) [Lissolo és mtsai 1984, Fernández és mtsai 1985]. Az aktiválás során a [NiFe] centrum redox változásokon megy keresztül, melyek EPR és FTIR technikával követhetőek és több enzimforma különíthető el (4. ábra). Az enzimformák reduktív és oxidatív kezelésekkel egymásba alakíthatóak.

A levegőn tisztított enzim inaktív, a Ni EPR jele alapján két oxidált enzimforma keveréke (Ni_u* és Ni_r*, régebbi elnevezésük Ni-A illetve Ni-B). A Ni 3+ oxidációs állapotban van. A csillag jel utal az EPR aktív állapotra. A Niu*-t unready, a Nir*-t ready állapotnak is nevezik. A Niu* állapotból az aktív forma kialakításához szükséges időtartam több óra is lehet, ezzel szemben a Nir* állapotból, ha nincs jelen oxigén, az enzim már rövid aktiválás után is képes a H₂ oxidációját katalizálni [Fernandez és mtsai 1985, Kurkin és mtsai 2004]. A szerkezeti leírásnál már említettem, hogy az oxidált formákban a Ni és Fe között valamilyen oxigént tartalmazó kétatomos ligand van jelen [Lamle és mtsai 2004, Volbeda és mtsai 2005, Ogata és mtsai 2005]. A Röntgen krisztallográfiás kísérletek arra utalnak, hogy az unready formákban egy peroxid ligand található a Ni és Fe atom között, a ready formákban pedig egy hidroxid csoport. Ezen ligandok eltérő természete okozza a két inaktív állapot különböző viselkedését. Az aktiválás folyamata során a két oxidált állapot EPR csendes intermediereken keresztül jut el a Ni_a-C* állapotba (régi elnevezése Ni-C), ami az enzim teljesen redukált, katalitikusan aktív formája, ebben az állapotban eltűnik a Ni és Fe közötti oxigén ligand [Garcin és mtsai 1999] és egy hidrid kötődik a helyére [Brecht és mtsai 2003, Foerster és mtsai 2003].



Allochromatium vinosum [NiFe] hidrogenázának redox állapotai és egymásba alakulásuk útvonalai [Kurkin és mtsai 2004]. Az **u,r** és **a** jelölések az **unready, ready** és **active** kifejezéseknek felelnek meg. Az EPR aktív, paramágneses formákat csillag jelzi, az EPR csendes, diamágneses formákat az S jelöli. A CO ligand FTIR értéke az alsó indexben látható. A Ni-A-nak a Ni_u*₁₉₄₅, a Ni-B-nek a Ni_r*₁₉₄₃, a Ni-C-nek a Ni_a-C* jelölés felel meg. A felső blokk az inaktív, oxidált enzimformákat mutatja, az alsó blokk a redukált, aktív formákat. Az egy szinten lévő enzimformák azonos redoxpotenciállal rendelkeznek.

Az EPR csendes intermediereket S-sel jelölik, ezekben a Ni 2+ oxidációs állapotban van (EPR <u>s</u>ilent). A Ni_a-C* állapotból az enzim egy redukált, EPR csendes formába képes átalakulni (Ni_a-SR). Oxigén hatására az aktív enzim azonnal a kétféle inaktív formába alakul át. ¹⁷O₂ alkalmazásával kimutatták, hogy ekkor az inaktív formák aktív centrumában megjelenő kétatomos ligand az oxigéntől származik [Van der Zwaan és mtsai 1990].

1.4.2. Enzim modellek

Az eddig leírt enzim modellek az EPR és IR spektroszkópiával azonosított enzimformákon alapulnak [De Lacey és mtsai 2000, Vignais és mtsai 2002, Armstrong és mtsai 2004, Kurkin és mtsai 2004] és alapvetően kétféle típusú modellre vezethetőek vissza (5. ábra). Mindkét modellben az oxidált formák (Ni_u* és Ni_r*) két külön úton

aktiválódnak és egy közös enzimformában egyesülnek (Ni_r-S₁₉₃₁). A trianguláris modellben az enzimciklust a Ni_a-S₁₉₃₁, a Ni_a-SR₁₉₃₆ és a Ni_a-C₁₉₅₀* enzimformák alkotják. A dupla enzimciklusos modellben a két egymásba kapcsolódó ciklusban a Ni_a-S₁₉₃₁/ Ni_a-C₁₉₅₀* és Ni_a-SR₁₉₃₆ /Ni_a-C₁₉₅₀* formák vesznek részt.





Különböző kinetikai modellek.

A hidrogenáz reakció trianguláris (A) és dupla enzimciklusos (B) modellje [Ősz és mtsai 2005]. A modellekben a 4. ábrán is látható, spektroszkópiailag elkülöníthető enzimformák szerepelnek.

A közelmúltban egy autokatalitikus enzim modellt javasoltak, amely a trianguláris modellhez hasonló, de az enzimciklusban egy autokatalitikus lépés is található a Ni_a-C* és Ni_a-S formák között (6. ábra) [Ősz és mtsai 2005]. Feltételezésük szerint a hidrogént már megkötött Ni_a-C* forma lép kölcsönhatásba a Ni_a-S formával és esetleg konformáció változás révén indukálja abban a hidrogén kötését, így a Ni_a-C* forma (azaz önmaga) képződését. A modell alapján az aktiválás során történik az oxigén komponens eltávolítása, majd az autokatalitikus lépés révén az enzimformák aránya megváltozik és a hidrogént kötő Ni_a-SR enzimforma dúsul fel.





Az autokatalitikus trianguláris model [Ősz és mtsai 2005]. Az 5. ábrán mutatott trianguláris modelltől abban tér el, hogy a Ni_a-S₁₉₃₁ forma egy autokatalitikus kölcsönhatás révén önmaga képződését segíti elő (piros nyíl).

1.4.3. Hidrogenáz aktivitás mérésére szolgáló módszerek

A hidrogenázok aktivitását többféle módon mérhetjük, az alábbi négy módszer a legáltalánosabb [Cammack és mtsai 1994].

1. Hidrogén termelés vagy redukció a következő egyenlet szerint:

$$2 D_{red} + 2 H^+ \rightleftharpoons 2 D_{ox} + H_2$$

A D az elektrondonor, ami bármilyen alacsony redoxpotenciállal rendelkező anyag lehet például citokróm c_3 , vagy valamilyen redoxfesték (pl. metil-viologén). A redoxfestékek ilyenkor az elektronmediátor szerepét töltik be, redukálásukhoz általában nátriumditionitot (Na₂S₂O₄) használnak.

2. Hidrogén felvétel vagy oxidáció a következő egyenlet szerint:

$$H_2 + 2 A_{ox} \rightleftharpoons 2 H^+ + 2 A_{red}$$

Az A az elektron akceptor, ami lehet alacsony (pl. citokróm c₃, metil-viologén) vagy magas redoxpotenciállal rendelkező anyag (mint a metilénkék vagy 2,6-dikloro-indofenol (DCIP)).

A fejlesztett ill. felhasznált hidrogén mennyiségét mérhetjük amperométerrel (hidrogén elektróddal), gáz nyomás alapján egy manométerrel vagy hővezető képesség érzékelővel (TCD) rendelkező gázkromatográffal. A reakciót spektrofotometriásan is követni tudjuk a D vagy A abszorpcióváltozása révén, ha redoxfestéket alkalmazunk (a redoxfestékek redukált és oxidált állapotban eltérő színűek).

 Deutérium vagy trícium kicserélődés protonnal elektron akceptor vagy elektron donor nélkül

A trícium kicserélődés trícium gázzal, vagy triciált vízzel történik, a képződő ³H₂O szcintillációs számlálóval, míg a trícium a gáz fázisban ionizációs kamrával mérhető. A reakció deutériummal is lejátszódik:

$${}^{2}H_{2} + 2 {}^{1}H_{2}O \Rightarrow {}^{1}H_{2} + 2 {}^{1}H^{2}HO$$

 ${}^{2}H_{2} + {}^{1}H_{2}O \Rightarrow {}^{1}H^{2}H + {}^{1}H^{2}HO$

Ilyenkor a két reakció aránya a hidrogenáz típusától, valamint egyéb körülményektől függ, mint például a pH. A deutérium tömegspektrometriás analízissel mutatható ki.

4. Hidrogén para-orto konverziója

$$pH_2 + H_2O \Rightarrow oH_2 + H_2O$$

A *p* és *o* a kötésben lévő elektronok spin állapotát jelölik (*para*: antiparalell spinek, *orto*: paralell spinek). A normál hidrogén gáz izomerek elegye, benne az *orto* hidrogén és *para* hidrogén aránya 3:1. Az izomerek spontán átalakulása igen ritka. A hidrogenázok a *para* izoformát képesek *orto* izoformába átalakítani. A reakció elektron donor, vagy akceptor nélkül zajlik és a hővezető képesség változásának mérésével követhető.

Az aktivitásmérések mindig anaerob körülmények között zajlanak, mivel a hidrogenázok működésük közben általában fokozottan érzékenyek az oxigénre. A reakcióelegyet egy jól zárható edénybe helyezik és lecserélik a légterét vákuumpumpa segítségével, vagy egyszerűen átfúvatják gázzal. Hidrogén fejlesztő mérésnél nitrogént vagy argont használnak. Az esetleges maradék oxigén lekötésére különböző oxigén csapdákat lehet alkalmazni, ilyen például a glükóz/glükóz oxidáz rendszer, ahol az

enzim a glükóz oxidálása közben felhasználja a jelen levő maradék oxigént. A redoxfesték redukálásához használt nátrium-ditionit képes kis mennyiségű oxigén redukálására is.

1.5. Hidrogenázok bioszintézise és érése

A hidrogenázok érése bonyolult, több lépcsős folyamat, amely mindig a citoplazmában megy végbe. A [NiFe] hidrogenázok érését ismerjük részletesebben [Blokesch és mtsai 2002a, Blokesch és mtsai 2002b]. A folyamatot kisegítő fehérjék koordinálják, melyek az érés során megfelelő konformációban tartják a prekurzorokat és a különböző elemek beépítését végzik. Ezeket a fehérjéket kódoló gének egyes élőlényekben a struktúr génekkel egy operonban, másokban a kromoszómán szétszórva helyezkedhetnek el. Vannak köztük az organizmus több hidrogenázának érésében szerepet játszó Hyp (Hyp, <u>hy</u>drogen pleiotropy) fehérjék, vannak az adott hidrogenázra specifikus érési fehérjék, mint például a nagy alegység C terminálisának hasítását végző endopeptidáz és vannak olyan kisegítő fehérjék is, melyek más fémtartalmú fehérjék (pl. nitrogenáz) szintézisében is szerepet játszanak. Általánosan elmondható, hogy egy [NiFe] hidrogenáz éréséhez legalább hat Hyp segítő fehérje (HypA, HypB, HypC, HypD, HypE és HypF), egy specifikus endopeptidáz és a kis alegység FeS kockáinak beépülését segítő fehérjék szükségesek.

Részletesen az *Escherichia coli* harmadik hidrogenázának (Hyc) érését vizsgálták [Forzi és mtsai 2007] és kisebb eltérésekkel ezt a modellt (7. ábra) gondolják érvényesnek más [NiFe] hidrogenázok érésére is.

Az *E. coli* genomja négy [NiFe] hidrogenázt kódol, ezek közül három hidrogenáz különböző anaerob növesztési körülmények alatt expresszálódik, míg a negyedik feltételezett hidrogenáz expresszálásához szükséges növesztési körülmények még nem ismertek.

A Hyc egy formát hidrogénliáz komplex tagja, ami a formát szén-dioxiddá és hidrogénné alakítását végzi [Rossmann és mtsai 1991]. A kis és nagy alegység érése külön történik.

A nagy alegység polipeptidláncába előbb a Fe atom kerül be a megfelelő ligandokkal (CN⁻ és CO molekulák). A CN⁻ ligandok karbamoil-foszfátból szintetizálódnak, a CO ligandok eredete még nem tisztázott [Forzi és mtsai 2007]. A HypF fehérje ATP hidrolízis mellett egy adenilált karbamoil-foszfát kialakulását katalizálja, aminek a karbamoil csoportja a HypE fehérjére kerül át, ahol újabb ATP

hidrolízis mellett dehidratálódik és kialakul a cianid csoport. A Fe atom eredete szintén nem ismert, a HypC és HypD fehérjékkel képez komplexet, amíg a HypF és HypE fehérjék közreműködése révén a CN⁻ és CO ligandok hozzákapcsolódnak. Ezután a nagy alegység prekurzorával a HypC chaperon komplexet képez és a Fe atom és ligandjainak prekurzorba helyezését katalizálja. A Ni atom csak ezt követően épül be a katalitikus centrumba a HypA és HypB fehérjék segítségével. A HypB fehérje C terminálisán egy konzervált GTP kötő motívum található és a GTPáz aktivitás elengedhetetlen a Ni nagy alegységbe való behelyezéséhez [Maier és mtsai 1995]. A Ni megfelelő behelyezése után a HypC disszociál a nagy alegység prekurzoráról és egy specifikus endopeptidáz, a HycI egy 32 aminosavas peptidet hasít le a prekurzor nagy alegység C terminálisáról [Magalon és mtsai 2000]. A lehasított peptid mérete az egyes hidrogenázoknál változó, a HycI-vel homológ endopeptidázok egy konzervált hisztidint vagy arginint ismernek fel a C-terminális CX₂CX₂H/R motívumban [Theodoratou és mtsai 2000a, Theodoratou és mtsai 2000b]. A hasítás nagy konformációs változást eredményez, mely során a [NiFe] aktív hely bezáródik és a nagy alegység végleges, natív konformációja kialakul.

A kis alegység polipeptid láncába az érés során vas-kén kockák épülnek be. A nitrogenáz bioszintéziséhez szükséges gének valószínűleg minden vas-kén kockákat tartalmazó fehérje érésében, így a hidrogenázokéban is szerepet játszanak. Leginkább ismertek a NifS-re és NifU-ra hasonlító fehérjék (pl. IscS és IscU), melyek a kén aktiválását és vassal történő összerendeződését katalizálják [Yuvanlyama és mtsai 2000].

Az érési folyamat végén a nagy alegység az érett kis alegységgel komplexet képez és kialakul a működőképes heterodimer szerkezet.

Az *E. coli*-ban azonosított segítő fehérjéket kódoló gének homológjait más organizmusokban is megtalálták. *Thiocapsa roseopersicina*-ban két HypC (HypC₁ és HypC₂) fehérjét is azonosítottak [Maróti és mtsai 2003]. *Ralstonia eutropha*-ban a szolubilis [NiFe] hidrogenáz aktív helyén a Fe kettő helyett három, a Ni egy CN⁻ liganddal rendelkezik. A hypX gén mutációjakor a négy CN⁻ ligand helyett csak hármat találtak az aktív centrumban [van der Linden és mtsai 2004, Bleijlevens és mtsai 2004].

Nem minden [NiFe] hidrogenáz érésekor történik C-terminális végi hasítás a nagy alegységen. A H₂ érzékelő hidrogenázok (pl. HupUV *Rhodobacter capsulatus*-ban, HoxBC *Ralstonia eutropha*-ban) és más hidrogenázok (Ech *Methanosarcina barkeri*-



ben és a CO indukált Coo *Rhodospirillum rubrum*-ban) nem igényelnek proteolitikus hasítást az érésük során.

7. ábra

A [NiFe] hidrogenázok bioszintézise [Blokesch és mtsai 2002b]. Az ábrán a nagy alegység kialakulásának lépései láthatóak.

A [NiFe] hidrogenázok bioszintéziséhez a Ni és Fe felvételt biztosító transzportrendszerek fehérjéi is szükségesek [Cammack és mtsai 2001]. *Ralstonia eutropha*-ban egy Ni²⁺ specifikus permeáz, amit a *hoxN* kódol, *E. coli*-ban a *nik* lókusz génjei szükségesek a nikkel felvételéhez. A Fe felvételéhez Fe kelátorokat, ún. sziderofórokat szekretálnak a sejtek, és a Fe-sziderofór komplexeket több transzport rendszer is megköti.

1.5.1. Membrán targeting és transzlokáció

A periplazmikus és membránkötött hidrogenázok a Tat (twin arginin transport) rendszer révén jutnak el fiziológiás helyükre, a membránhoz illetve a periplazmába. A Tat rendszer a hidrogenázokon kívül számos redox kofaktort tartalmazó fehérje transzlokációját is végzi [Berks és mtsai 1996], mint például az *E. coli* molibdo kofaktort tartalmazó formát-dehidrogenáz [Sargent és mtsai 1998, Sargent és mtsai 1999] illetve nitrát-reduktáz [Weiner és mtsai 1998]. A transzport rendszert alkotó

fehérjék génjei a baktériumok legtöbb csoportjában, valamint a mitokondriumokban és a kloroplasztokban is megtalálhatóak.

A periplazmatikus és membránkötött hidrogenázok általában heterodimerek, egy kis és egy nagy alegységből állnak és a kis alegységükön található egy targeting szignál (szignál szekvencia), ami egy konzervált RRxxFxK motívumot tartalmaz [Voorduw és mtsai 1992, Wu és mtsai 1993]. A kis alegység csakis az érett nagy alegységgel együtt jut át a membránon, miközben a szignál szekvencia lehasítódik [Rodrigue és mtsai 1999].

1.6. A Thiocapsa roseopersicina jellemzése és hidrogenázai

A *Thiocapsa roseopersicina* egy Gram negatív baktérium, a gammaproteobaktériumokon belül a fotoszintetizáló bíbor kénbaktériumok csoportjába (Chromatiales, Chromatiaceae család) tartozik. A sejtek gömb alakúak vagy ovoidok, átmérőjük 1-3 µm (8. ábra b). A tápoldatban egyesével, vagy kettő, négy, ritkán több sejtből álló aggregátumok formájában fordulnak elő. Az érett kultúrák színe sötét meggypiros (8. ábra a). Fény jelenlétében anaerob körülmények között fotoautrotróf módon nőnek, szulfidot vagy tioszulfátot használva elektron donorként a szén-dioxid asszimilációhoz. A szulfid oxidáció folyamán a sejtek időlegesen kenet raktároznak. A baktérium képes a légköri nitrogén megkötésére. Aerob körülmények között sötétben is tudnak szaporodni, ilyenkor fakultatív kemoautotróf módon nőnek. Előfordulnak napsütötte sekély állóvizek oxigénszegény rétegeiben, homokos tengerpartokon, és olyan szennyvizekben, amelyben van elegendő hidrogén-szulfid és szerves komponens.



8. ábra

Thiocapsa roseopersicina folyadékkultúrája (a) és elektronmikroszkópos képe (b).

A *Thiocapsa roseopersicina* legalább négy [NiFe] hidrogenázzal rendelkezik, ezek pontos fiziológiai funkciója még nem ismert. Kettő közülük membrán asszociált, periplazmatikus, kettő pedig citoplazmatikus fehérje (9. ábra).



A *Thiocapsa roseopersicina* membán asszociált (HynSL, HupSL) és citoplazmatikus (HoxEFUYH, HupUV) hidrogenázai.

A két membrán asszociált hidrogenáz (HupSL és HynSL) 46 % aminosav homológiát mutat [Kovács és mtsai 2002, Colbeau és mtsai 1994]. A HupSL érzékeny a hőre és az oxigénre, ha eltávolítjuk a fotoszintetikus membránból. Szerepe valószínűleg a nitrogénfixáláskor a nitrogenáz által termelt hidrogén felvételében van. A HynSL hidrogenázt külön fejezetben jellemzem, mivel munkám során ennek az enzimnek a működését vizsgáltuk.

A HoxEFUYH hidrogenáz a citoplazmában található heteropentamer fehérjekomplex. A cianobakteriális NAD-redukáló kétirányú [NiFe] hidrogenázokkal mutat szekvencia hasonlóságot [Rákhely és mtsai 2004, Rákhely és mtsai 2007, Palágyi-Mészáros és mtsai 2008]. A HoxFU diaforáz aktivitással rendelkező alegysége redukálja a NAD-ot, a HoxYH alegysége a hidrogenáz aktivitásért felelős. A HoxE alegység szerepe még nem tisztázott, de a komplex *in vivo* működéséhez szükséges.

A citoplazmatikus HupUV a hidrogén érzékelő hidrogenázokhoz tartozik. Hasonlít a *Rhodobacter capsulatus* HupUV [Dischert és mtsai 1999, Elsen és mtsai 2003] és a *Ralstonia eutropha* HoxBC hidrogenázához [Lenz és mtsai 2002], melyek szerepe a baktérium többi hidrogenáza szintézisének hidrogéntől függő transzkripciós szintű szabályozása. A hidrogén érzékelő hidrogenáz kölcsönhatásba lép egy kétkomponensű szignál transzdukciós rendszer egyik elemével, egy autofoszforilációra képes hisztidin kinázzal (*R. capsulatus*-ban HupT, *R. eutropha*-ban HoxJ), amely a szignál transzdukciós rendszer másik elemét, egy transzkripciós faktort (HupR *R. capsulatus*-ban, HoxA *R. eutropha*-ban) aktivál illetve inaktivál foszforilációval. A transzkripciós faktor a baktérium más hidrogenázainak expresszióját indukálja. *Thiocapsa*-ban azonosították a szabályozó rendszer több elemét (HupT és HupR), amely a HupSL hidrogenáz expresszióját szabályozhatnák, de eddigi ismereteink szerint a *Thiocapsa* sejtek ezt a rendszert nem használják [Kovács és mtsai 2005].

1.6.1. A stabil HynSL hidrogenáz

A membrán asszociált HynSL (régi nevezéktan szerint HydSL) stabil hidrogenáz régóta ismert [Bagyinka és mtsai 1982, Kovács és mtsai 1990], két alegységes fehérje (64 ill. 34 kDa), a [NiFe]-hidrogenázok közé tartozik. A *Thiocapsa* eddig ismert négy hidrogenáza közül csak a stabil Hyn hidrogenáz tisztítható biokémiai és biofizikai mérésekhez megfelelő mennyiségben és tisztaságban. Kristályszerkezete még nem ismert, de számítógépes modellezéssel készítettek egy szerkezeti modellt [Szilágyi és mtsai 2002]. Molekulánként két vas-kén kockát és egy [NiFe] centrumot tartalmaz. A Ni a binukleáris katalitikus centrumban helyezkedik el a nagy alegységen és legalább két cisztein tioláton és két más típusú kötésen keresztül kapcsolódik a fehérjéhez [Bagyinka és mtsai 1993].



10. ábra

A Hyn hidrogenáz hidrogén fejlesztő (1) és hidrogén felvevő (2) aktivitásának pH függése 2 mM metil viologén, mint elektron akceptor jelenlétében [Zorin és mtsai 1996].

Az enzim jellemzője, hogy hőstabil, habár maga a baktérium nem termofil, proteolitikus emésztésnek jól ellenáll, és aerob körülmények között is megőrzi aktivitását [Kovács és mtsai 1990, Kovács és mtsai 1988]. E tulajdonságaiban eltér más [NiFe]-hidrogenázoktól. A hidrogén felvevő és hidrogén fejlesztő reakciót is képes katalizálni (10. ábra). Fiziológiás szerepe lehet a sejtben a HupSL-hez hasonlóan a nitrogenáz rendszer által termelt hidrogén eloxidálása és a membránpotenciál fenntartása, de fontos megjegyezni, hogy nem nitrogénfixáló körülmények között is jelen van a sejtben.

A sejtben a stabil hidrogenáz konstitutívan fejeződik ki. A két alegységet a *hynS* (kis alegység) ill. *hynL* (nagy alegység) gének kódolják, az előbbi egy 370, az utóbbi egy 577 aminosavas fehérjét, melyekből az érett HynS (34,062 kDa) és HynL (63,892 kDa) lesz. A két gén közé egy, nem az enzimet kódoló intergenomikus szekvencia ékelődik be (11. ábra), így a génelrendeződés elég sajátos, mivel általában az egy fehérje két alegységét kódoló gének közvetlenül egymás után következnek. Az intergenomikus szekvencia két nyitott olvasási keretet tartalmaz (ORF: <u>open r</u>eading <u>f</u>rame). Az Isp1 és Isp2 a feltételezett fehérjetermékek; az Isp1 néhány transzmembrán doménnel és egy b-típusú hem kötőhellyel rendelkezik, az Isp2 pedig a heterodiszulfid reduktázokkal mutat hasonlóságot [Rákhely és mtsai 1998, Dahl és mtsai 1999]. Mindkét fehérje szükséges a hidrogenáz *in vivo* működéséhez, ugyanakkor hiányukban az enzim *in vitro* aktivitása nem változik [Palágyi-Mészáros és mtsai 2008], ezért a jelenlegi feltételezések szerint a Hyn hidrogenáz redox partnerekkel történő elektron transzfer folyamataiban játszanak szerepet.



11. ábra

A Hyn operon szerkezete. A struktúrgének (*hynS* és *hynL*) közé egy intergenomikus szekvencia ékelődik be, ami két nyitott olvasási keretet tartalmaz (*isp1* és *isp2*).

Más [NiFe] hidrogenázokhoz hasonlóan EPR mérésekkel több enzimforma azonosítható: Ni_u*, Ni_r* és Ni_a-C* [Cammack és mtsai 1989]. Kétdimenziós SDS gélelektroforézis kísérletekkel kimutatták, hogy különböző konformációjú enzimformákat lehet előállítani [Tigyi és mtsai 1986]. Két aktivitással rendelkező enzimformát tudtak elkülöníteni, egy 90 kDa-os látszólagos mólsúlyú és egy 49 kDa-os látszólagos mólsúlyú formát. A 90 kDa-os forma oxigénre érzékeny volt, míg a 49 kDaos forma oxigénnek jól ellenállt.

Az aktivitás mérési kísérletek során derült fény az enzim sajátos működésére, arra hogy a hidrogenáz reakció autokatalitikus reakciókra jellemző tulajdonságokat mutat. Az enzim specifikus aktivitása függ az enzimkoncentrációtól, és a hidrogén felvevő reakció lag fázissal indul [Dér és mtsai 1985, Bagyinka és mtsai 1984, Ősz és mtsai 2005a, Ősz és mtsai 2005b], aminek a hossza fordítottan arányos az enzimkoncentrációval és elég magas enzimkoncentrációnál el is tűnik. A hidrogénfelvevő irányú reakcióban autokatalitikus oszcillációt tapasztaltak [Bagyinka és mtsai 2003]. A reakciónak speciális térbeli mintázata van, amely küvettában és vékonyréteg kísérletekben is jól megfigyelhető [Ősz és mtsai 2005a]. Ez utóbbi esetében a reakció (amit a kék redukált benzil viologén megjelenése jelez) diszkrét pontokból indul el, melyek állandó sebességgel nőnek, míg a teljes reakcióelegy be nem kékül. Állandó sebességgel haladó reakciófrontok az autokatalitikus reakciókra jellemzőek [Showalter és mtsai 1981, Weitz és mtsai 1984, Bazsa és mtsai 1985]. A reakció startpontjának kialakulása indukálható a hidrogénfelvételen már átesett reakcióelegy, vagy H₂-nel aktivált enzim segítségével. A reakció startpontjának indukálására az alacsony koncentrációban használt redukált benzil viologén vagy anaerob, de nem aktivált enzim alkalmazása hatástalannak bizonyult. Ez arra utal, hogy az autokatalizátor valószínűleg egy enzimforma és nem a termék, vagyis nem a redukált elektron akceptor. Az enzimre felállított autokatalitikus reakciómodell szerint végzett számolások alátámasztották a kísérleti megfigyeléseket [Ősz és mtsai 2005b] és a hidrogenázok működésére előzőleg leírt modellek alapján egy módosított autokatalitikus trianguláris enzimmodellt javasoltak. Ezt a modellt a hidrogenázok működéséről szóló részben fejtettem ki bővebben.

Az autokatalitikus viselkedés nem csak a *Thiocapsa roseopersicina* HynSL hidrogenázára jellemző, csak nem mindig ismerték fel, hogy ez áll a tapasztalt jelenségek hátterében. A *Desulfovibrio gigas* periplazmatikus hidrogenázának aktivitás mérése során szintén megfigyeltek lag fázist [Fernandez és mtsai 1985], továbbá leírták azt is, hogy a redukált elektron akceptor megjelenése nem homogén a küvettában. A lag fázis alatt a reakciót egy korábban már lejátszódott reakcióelegyből vett mintával azonnal indítani tudták. A szerzők ugyan leírták ezeket a jelenségeket, de megmagyarázni nem tudták.

1.7. Az autokatalízis

Tekintettel arra, hogy dolgozatom központi kérdése a hidrogenáz enzim autokatalitikus viselkedése, részletesebben is meg kell tárgyalnom ennek a jelenségnek mibenlétét, meghatározását, és róla a kémia és a biológia területén eddig összegyűlt ismereteinket, illetve, hogy a Hyn hidrogenáz esetében hogyan valósulhat meg ez a folyamat.

1.7.1. Autokatalízis a kémiában

Az autokatalízis fogalmát először kémiai reakcióknál írták le. Az első megfigyelt autokatalitikus reakció a szerves észterek savas közegben lejátszódó hidrolízise volt. Ezeknél a reakcióknál az egyik végtermék a katalizátor, mely önmaga képződését katalizálja (autokatalizátor) és ahogy az idő haladásával növekszik a koncentrációja, úgy növekszik a reakciósebesség is, míg az egyensúlyi állapot be nem áll (12. ábra). A reakció kezdetén az autokatalizátor kis koncentrációban van jelen, ezért a reakciósebesség egy ideig alacsony. Ezt az időtartamot nevezik indukciós időnek (lag fázisnak), mely az autokatalitikus reakciók egyik jellemzője. A lag fázis alatt a reaktánsok koncentrációja alig változik, majd a reakciósebesség hirtelen növekedésével párhuzamosan csökken. Tipikus tulajdonsága az ilyen reakcióknak, hogy az autokatalizátor reakcióelegybe adása növeli a reakciósebességet és csökkenti a lag fázis hosszát. Fontos azonban megjegyezni, hogy indukciós idő nem csak autokatalitikus reakciónál jelenik meg. Konszekutív reakció esetén köztitermék alakul ki, ami a végtermék megjelenését késlelteti és ez az oka az indukciós időnek. Egy másik lehetséges eset, hogy a reakcióelegyben jelenlévő inhibitor egy mellékreakcióban lassan elreagál, és ezt követően jelenik csak meg a termék.

Egy egyszerű autokatalitikus reakciót véve A \Rightarrow B, ahol az A a reaktáns, a B az autokatalizátor és a végtermék egyben, k₁ a kinetikai állandó, a reakciósebességet a következőképpen írhatjuk le: v = k₁ × A × B.

Vagyis egy reakció autokatalitikus, ha a reakciósebesség nemcsak a reaktáns, hanem a végtermék koncentrációjától is függ. Tipikus autokatalitikus koncentráció-idő görbe látható a 12. ábrán. Ezt a görbetípust szigmoid görbének nevezik, mely jól jellemezhető három paraméterrel [Bazsa és mtsai 1992]:

1. a görbe inflexiós pontjához tartozó t_{inf} érték,

- a t_{inf} időponthoz tartozó maximális meredekség, ami a maximális reakciósebességnek felel meg (v_{max}),
- a maximális konverzió, ami irreverzibilis reakcióknál 1, de autokatalitikus reakciókban általában nagyobb, mint 0,5.



12. ábra

Tipikus autokatalitikus koncentráció-idő görbe [Bazsa és mtsai 1992]. Három paraméterrel jellemezhető; a görbe inflexiós pontjához tartozó t_{inf} értékkel, a t_{inf} időponthoz tartozó maximális meredekséggel, ami a maximális reakciósebességnek felel meg (v_{max}), és a maximális konverzióval.

Az autokatalitikus rendszerek folyamatosan kevert tankreaktorban (CSTR), de akár zárt rendszerben is bistabilitással, esetenként multistabilitással rendelkezhetnek [Bazsa 1992]. A komponensek oszcillálhatnak is több stabil állapot között, azonban ez nem mindegyik autokatalitikus reakcióra igaz. Zárt rendszerben csakis csillapított oszcilláció jöhet létre.

Egy autokatalitikus reakció térbeli mintázatot mutat, amely egy dimenzióban (például kémcsőben) és két dimenzióban (vékony rétegben, például egy Petri csészében) is vizsgálható. Ha egy szubsztrátot tartalmazó cső végébe autokatalizátort cseppentünk, akkor abban a térfogatrészben elindul és lezajlik a reakció, míg a szubsztrát el nem fogy. A szomszédos térfogatrészben azonban nincs jelen autokatalizátor, ezért hatalmas koncentrációgrádiens alakul ki, így az autokatalizátor gyors diffúziójával a reakció

tovább halad, végig a cső mentén. Ez az autokatalitikus hullám, amely végighalad a csövön, a reakciófront pedig az a tartomány, amely előtt felhalmozódott az autokatalizátor és mögötte pedig csak a szubsztrát helyezkedik el (13. ábra).



Autokatalitikus hullám terjedése [Bazsa és mtsai 1992]. A sötét cellákban (térrészben) nagy autokatalizátor koncentráció, a szürke cellákban alacsony autokatalizátor koncentráció van. A fehér cellákban nincs jelen autokatalizátor.

Vékonyrétegben vizsgálva a reakciót koncentrikus körként haladó frontot látunk, oszcilláló rendszer esetén a frontok egymást követik. A kör középpontja az a pont, ahol a reakció spontán elindul, vagy ahol indítják a reakciót az autokatalizátor cseppentésével, vagy más módon, például elektróddal. Az autokatalitikus front jellemzője az állandó haladási sebesség [Showalter és mtsai 1981, Weitz és mtsai 1984, Bazsa és mtsai 1985, Harrison és mtsai 1986, Needham és mtsai 1992, Epstein és Pojman 1998].

1.7.2. Autokatalízis a biológiában

Az autokatalízis a biológiában is megfigyelhető. A sejtosztódás például egy tipikus autokatalitikus példának tekinthető. A fehérje reakciókban háromféle típusú autokatalízist ismerünk:

1. Foszforiláz típusú autokatalízis

Az inaktív enzimforma az aktív enzimforma szubsztrátja.

Bizonyos kinázok autofoszforilációra képesek, így aktiválódnak és foszforilálni képesek további fehérjéket. *R. capsulatus*-ban például a HupSL hidrogenáz transzkripcióját szabályozó rendszer része egy hisztidin kináz (HupT), amely autofoszforilációra képes.

In vitro oszcilláló rendszert állítottak elő a cianobakteriális KaiA, KaiB és KaiC fehérje és ATP segítségével [Nakajima és mtsai 2005]. A három fehérje a cianobaktériumok cirkadián ritmusának szabályozásában vesz részt, más gének transzkripciós-transzlációs negatív feedback szabályozása révén. Nemrégiben kimutatták, hogy együtt inkubálva a három tisztított fehérjét és ATP-t, a KaiC foszforiláció szintje ritmikus változást, oszcillációt mutat. A KaiC autofoszforilációra és autodefoszforilációra képes, a KaiA fehérje elősegíti KaiC autofoszforilációját, míg a KaiB a KaiA fehérje hatását gyengíti. A kísérletes eredményeket egy autokatalitikus lépést tartalmazó modellel lehetett jól leírni [Mehra és mtsai 2006].

2. Termék aktiválás típusú autokatalízis

A reakció egyik terméke aktiválja az inaktív enzimformát.

Ilyen például az allosztérikus szabályozás egyik formája, amikor az aktív konformáció kialakulását a termék allosztérikus helyre kötődése indukálja, amely hely eltér az aktív helytől.

3. Prion típusú autokatalízis

A fehérje kétféle konformációban fordul elő és két eltérő konformációban lévő fehérjeforma kölcsönhatásának eredménye két azonos konformációval rendelkező forma, azaz az egyik forma önmaga kialakulását katalizálja.

A prionok fehérje természetű fertőző patogének, amelyek számos letális neurodegeneratív betegséget okoznak, úgy, mint a humán Creutzfeldt–Jakob-szindróma (CJD), a juhok kergekórja (scrapie), vagy a szarvasmarhák szivacsos agyvelőgyulladása (BSE) [Prusiner és mtsai 1998, Skhundina és mtsai 2008]. A prionok részt vehetnek genetikai eredetű, fertőző vagy szórványosan előforduló megbetegedésekben. A megbetegedések oka a normális, celluláris PrP^{C} fehérje forma átalakulása a kóros PrP^{Sc} formába. A kóros forma sokkal több β redő szerkezetet tartalmaz a normális formához hasonlítva és fizikai-kémiai tulajdonságaiban is eltér tőle, (1. táblázat), például a PrP^{Sc} monomerek polimerek (amiloid) képzésére képesek. Az átalakulás során a kóros forma

$$PrP^{C} + PrP^{Sc} \rightarrow 2 PrP^{Sc}$$

Tulajdonság	PrP ^C forma	PrP ^{Sc} forma
Ultraibolya (UV), ionizáló	károsodik	rendkívül ellenálló
sugárzás hatása		
Proteolitikus emésztés	degradálódik	rendkívül ellenálló
hatása		
Hőtűrés	átlagos	rendkívűl hőtűrő
α -hélix - β -redő szerkezet	40 % - kevés	30 % - 45 %
aránya		
Aggregációs hajlam	szolubilis	szabálytalan pálca alakú aggregátumok
Lokalizáció	intracelluláris	extracelluláris
Patogenitás	természetes	patogén
	sejtfehérje	

1. táblázat

A PrP^C és PrP^{Sc} formák szerkezetének, elhelyezkedésének, patogenitásának és különböző külső hatásokkal szembeni ellenállásának összehasonlítása.

Az átalakulás mechanizmusára több elmélet is van [Skhundina és mtsai 2008]. A heterodimer modell szerint egy PrP^C és egy PrP^{Sc} forma kölcsönhatása egy PrP^CPrP^{Sc} heterodimert eredményez, ami PrP^{Sc} homodimerré alakul, majd aggregáció révén kialakul a polimer. A polimerizációs modell szerint először egy PrP^{Sc} mag alakul ki, ami egy oligomer szerkezet. Ezt a lassú folyamatot egy gyors polimerizáció követi.

1.7.3. Autokatalízis a Hyn működése során

A Hyn hidrogenáz esetében a prion típusú autokatalízis tűnik a legvalószínűbbnek. A Hyn-nek különböző konformációban lévő formái vannak, melyek aktivitásukban és oxigénnel szembeni ellenállásukban is eltérnek (lásd Hyn jellemzése).

Vizsgálták egy lehetséges allosztérikus hely meglétét is [Ősz Judit 2005]. Aktivitásra festett poliakrilamid gélben megfuttatták a hidrogenázt, a hidrogenáz által megfestett kék csíkot (redukált benzil viologén) tartalmazó géldarabot anaerob üvegbe zárták és nitrogénre cserélték a légteret. Egy nap múlva hidrogén jelent meg az üveg légterében és a kék szín eltűnt. A gélben a diffúzó gátolt, vagyis ha létezne allosztérikus kötőhely, akkor a hidrogenáz nem tudta volna felhasználni a meglévő redukált benzil viologént a hidrogén fejlesztésére.

Ha valóban a prionokhoz hasonlóan két eltérő konformációban lévő enzimforma hat kölcsön egymással az autokatalitikus lépés során, akkor rövid időre a fehérje-fehérje kölcsönhatás miatt fehérje komplexek alakulnak ki. Ez a kölcsönhatás a fehérje konformációjára ható faktorokkal, mint például a Hofmeister sorozat sói, valószínűleg befolyásolható.

1.8. A sók Hofmeister sorozata

Franz Hofmeister a 19. század végén kimutatta, hogy a sók befolyásolják a fehérjék oldékonyságát [Hofmeister 1888]. Az általa vizsgált kationokat és anionokat sorba rendezte a fehérjékre gyakorolt stabilizáló illetve destabilizáló hatásuk alapján (14. ábra), ezt nevezzük Hofmeister sorozatnak [Cacace és mtsai 1997, Kunz és mtsai 2004, Dér és mtsai 2007]. Az anionok által kifejtett hatás erőteljesebbnek bizonyult a kationokéhoz képest.

$$F^- \approx {\rm SO}_4^{2-} > {\rm HPO}_4^{2-} > {\rm acetate} > {\rm Cl}^- > {\rm NO}_3^- > {\rm Br}^- > {\rm ClO}_3^- > {\rm I}^- > {\rm ClO}_4^- > {\rm SCN}^-$$

14. ábra

Az anionok Hofmeister sorozata.

A Hofmeister sorozat bal oldalán a kozmotróp sók találhatók, melyek a fehérje stabilitását növelik, és az oldhatóságát csökkentik, ezért a fehérje oldatból kiválását segítik elő ("salting out" hatás), ugyanakkor mivel a fehérje natív konformációját stabilizálják, növelhetik egy enzim aktivitását, de ennek ellenkezője is előfordulhat [Dér és mtsai 1998].

A sorozat jobb oldalán a kaotróp sók helyezkednek el. Ezek a fehérje oldékonyságát növelik ("salting in" hatás) és csökkentik a fehérje stabilitását, emiatt általában csökkentik egy enzim aktivitását.

2. Célkitűzések

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

E célok eléréséhez a következő tennivalókat és kísérleteket terveztem:

- új vékonyréteg kísérleti rendszer kialakítása, hogy a frontsebességet pontosan meg tudjuk határozni,
- a frontsebesség enzim koncentrációtól való függésének vizsgálata az új vékonyréteg kísérleti rendszerben, hogy igazoljuk az autokatalizátor fehérje természetét,
- az autokatalitikus fehérje kölcsönhatás során kialakuló fehérje komplexek kimutatása egy fehérje keresztkötési technika segítségével (PICUP, <u>photo-induced</u> <u>cross-linking of unmodified proteins</u>),
- konformáció változás kimutatása a hidrogenáz hidrogénnel történő aktiválása során dinamikus fényszóródás (DLS, <u>dynamic light s</u>cattering) mérésekkel,
- a Hofmeister sorozatból származó anionok autokatalitikus mintázatra és frontsebességre gyakorolt hatásának a vizsgálata az új vékonyréteg kísérleti rendszerben,
- a frontsebesség elektron akceptor koncentrációtól, hidrogén koncentrációtól és hidrogénion koncentrációtól való függésének vizsgálata az új vékonyréteg kísérleti rendszerben,
- olyan reakciókörülmények keresése, melyek között a hidrogenáz reakció oszcilláló viselkedést mutat,
- újabb kinetikai modellek elemzésével az autokatalitikus kölcsönhatás elhelyezése a hidrogenáz reakcióban.

20 g NaCl

3. Anyagok és módszerek

3.1. A Thiocapsa roseopersicina tenyésztése

A baktérium tenyésztésére használt tápoldat összetétele 1000 ml desztillált vízre vonatkoztatva:

1 g KH₂PO₄ 1 g MgCl_2 1 g KCl 1 g NH₄Cl 2 g NaHCO₃ 2 g Na-acetát $2 g Na_2S_2O_3 x 5 H_2O$ $0,5 \text{ g Na}_2\text{S}$ 200 μ l B₁₂ vitamin (100 g/ml) 1 ml NiCl₂ x 6 H₂O (3 mM oldat) 1 ml mikroelem oldat 1 ml Fe-EDTA (3360,5 g/l) Ezután a pH-t 7,0-7,5-re kell állítani. A mikroelem oldat összetétele 1000 ml desztillált vízben: Selecton B₂ 2975 mg bórsav H₃BO₄ 300 mg $CaCl_2 \ge 6 H_2O$ 200 mg $ZnSO_4 \times 7 H_2O$ 100 mg

 $\begin{array}{ll} MnCl_2 \ x \ 4 \ H_2O & 30 \ mg \\ Na_2MoO_4 \ x \ 2 \ H_2O & 30 \ mg \\ NiCl_2 \ x \ 6 \ H_2O & 20 \ mg \\ CuCl_2 \ x \ 2 \ H_2O & 10 \ mg \end{array}$

A baktériumokat 28 °C-on, lámpával megvilágítva tenyésztettük csiszolt dugós Erlenmeyer lombikban. A lombikokat színültig töltve zártuk le, így biztosítottuk az anaerob körülményeket. Fehérje tisztításhoz a tenyészetet 75 literig szaporítottuk fel három lépésben, az átoltáshoz 10 %-os inokulumot használtunk. A 75 literes kultúrák növesztése 12,5 literes műanyag Nalgene ballonokban történt és általában 8-10 napot vett igénybe. Az érett kultúra sötét meggypiros színű, a ballon falán szabad szemmel is jól láthatók a kénkristályok. A tenyészetből G2-es szűrővel eltávolítottuk a kénkristályokat, majd ezután a sejteket átfolyós centrifugával (CEPA-LE) ülepítettük ki, és az így kapott nedves sejttömeggel (~300 g) dolgoztunk tovább.

3.2. A stabil hidrogenáz tisztítása

A tisztítás 75 literes folyadékkultúrából indult. A lecentrifugált nedves sejtszuszpenziót -20 °C-os 100 ill. 90 %-os acetonnal kezeltük, majd kiszárítottuk és így kaptuk az acetonos port, amely a denaturált fehérjéket tartalmazta (15. ábra).

acetonos por

DEAE anioncserélő kromatográfia pH 7,5 (D450) Butyl Sepharose hidrofób kromatográfia pH 7,5 (DB) Q Sepharose anioncserélő kromatográfia pH 7,5 (DBQ) Q Sepharose anioncserélő kromatográfia pH 5,5 (DBQQ) natív preparatív gélelektroforézis (15 %-os PAGE) (DBQQE) Q Sepharose anioncserélő kromatográfia pH 7,5 (DBQQEQ) vagy Phenyl S650 hidrofób kromatográfia pH 7,5 (DBQQEP) tisztaság ellenőrzése natív és SDS gélelektroforézissel (10-11 %-os PAGE) 15. ábra HynSL hidrogenáz tisztítás folyamatábrája. Az egyes tisztítási lépések után zárójelben az adott lépés során keletkezett minta elnevezése látható.

Az acetonos kezeléssel távolítottuk el a membránalkotókat és a membrán színanyagait. Az acetonos port desztillált vízben visszaoldottuk, lecentrifugáltuk, majd a felülúszót egy anioncserélő DEAE gyantára kötöttük. A kötés rázatásos módszerrel történt és 450 mM NaClot tartalmazó 20 mM Tris-HCl pH 7,5 pufferrel eluáltuk a hidrogenázt. A következő lépés egy hidrofób kölcsönhatású oszlopkromatográfia volt. A mintát 10 % ammónium-szulfát jelenlétében kötöttük fel egy Butyl-Sepharose oszlopra és a sókoncentráció csökkentésével eluáltuk a hidrogenázt. Ehhez és az ezt követő kromatográfiás lépésekhez egy Pharmacia használtunk. А következő típusú FPLC készüléket két lépés anioncserélő oszlopkromatográfiás lépés volt, Q-Sepharose gyantával, eltérő pufferekkel (Tris illetve MES) és más pH-n (pH 7,5 és pH 5,5). Ezután a töményített mintát 15 %-os natív poliakrilamid gélen megfuttattuk. A hidrogenáz csíkja általában jól elkülöníthető aranysárga sáv volt. A gélből kivágtuk a megfelelő csíkot, a gélt összetörtük és desztillált vízben kevertetve kioldottuk belőle a hidrogenázt. Ezután üvegszűrőn leszűrtük a mintát és Q-Sepharose vagy Phenyl S650 oszlopra kötöttük. A sókoncentráció növelésével illetve csökkentésével eluáltuk a hidrogenázt. Ezután még további natív ill. SDS poliakrilamid géleken megfuttattuk a kapott mintát a tisztaság ellenőrzéséhez. A kísérletekhez részlegesen tísztított vagy teljesen tiszta hidrogenázt használtunk. A fehérjekoncentráció meghatározására a 280 nm-en mért abszorpciót használtuk. Általában 1-2 mg tiszta hidrogenázt kaptunk a tisztítás végén.

3.3. Módosítatlan fehérjék fény által indukált keresztkötése (PICUP)

Ez a fehérje keresztkötési technika egy fénnyel gerjeszthető oxidánst használ az asszociált fehérjék gyors és hatékony összekötésére. A módszer elnevezése az angol rövidítésből adódik: photo-induced cross-linking of unmodified proteins (PICUP) [Fancy és mtsai 1999]. Az oxidáns a trisz-bipiridil-ruténium dikation, amely látható fénnyel gerjesztve, ammónium perszulfát, mint elektron akceptor jelenlétében képes a reakcióelegyben lévő fehérjék kovalens összekötésére. Ezen technika előnye a többi keresztkötési technikával szemben, hogy nem szükséges hosszú ideig inkubálni a mintát, mégis a keresztkötött produktumot tekintve jóval eredményesebb, és látható fényt használ. A feltételezett keresztkötési mechanizmust a következőképpen írhatjuk le.

A Ru(II)bpy₃²⁺ egy igen hatékony fénygyűjtő molekula, abszorpciós maximuma 452 nm-nél van vízben, moláris extinkciós koefficiense 14,700 M⁻¹. Fotolízise során gerjesztett állapotba kerül és képes egy elektront átadni a perszulfátnak, aminek következtében annak O-O kötése felhasad. A fotolízis eredménye tehát Ru(III), egy szulfát gyök és egy szulfát anion.

A Ru(III) oxidálja a tirozil oldalláncokat, így tirozil gyökök alakulnak ki, amelyek képesek másik tirozil oldallánccal kereszt kötni, ill. közeli nukleofil lizil vagy ciszteinil oldalláncok is megtámadhatják a gyököt és kereszt köthetnek vele.

Az eredmény kovalens kötéssel keresztkötött fehérje komplex lesz, amely poliakrilamid gélen megfuttatva és megfestve (ezüstfestés vagy Coomassie brilliant blue) láthatóvá tehető.

Az általunk összeállított megvilágítási rendszer a következő elemekből áll (16. ábra):

- fényforrás (NOVAFLEX Fiber Optic Illuminator, 150 W-os halogén izzóval),
- időzár (fényképezéshez használt modell) ill. stopper,
- szürke szűrő (a fény spektrális összetételét nem változtatja meg, csupán a fényintenzitás csökkentésében segít),
- mintatartó (ebbe került az 1,7 ml-es Eppendorf cső kinyitott kupakkal),
- fénymérő (LI-250 Light Meter, a fényintenzitás mérhető vele μmol foton/s/m² mértékegységben).

A rendszer révén szabályozni tudtuk, hogy mennyi ideig és milyen intenzitású fényt kapjon a minta. Mivel nem ismertük azt a fényintenzitás- és időtartományt, ahol a keresztkötés lejátszódik, ezért a módszert leíró cikkben is alkalmazott glutation-S-transzferázt (*Schistosoma japonicum*) használtuk először. A hidrogenázos kísérleteknél ezen eredmények alapján 50 µmol foton/s/m² fényintenzitást állítottunk be, és a mintát 1/2 s, 1s, 2 s, 4 s, 8 s, 16 s, 32 s, 64 s, 128 s ideig világítottuk meg. A keresztkötési kísérleteket a hidrogenáz inaktív és aktiválás alatt lévő állapotában (H₂ alatti állapot) végeztük.



16. ábra A fehérje keresztkötési kísérletekben használt megvilágítási rendszer.
Az egyes reakcióelegyek térfogata 20 μl volt. Minden kísérletnél az elegy a megadott mennyiségben tartalmazott tiszta hidrogenázt (DBQQEQ), 20 mM Na-foszfát pH 7,5 puffert, 150 mM NaCl-ot, 0,125 mM Ru(bpy)₃Cl₂-ot és 2,5 mM APS-t. A megvilágítás után a reakciót 20 μl SDS mintafelvivő pufferrel állítottuk le. Az így kapott mintákat, ezután 10 ill. 20 percig forraltuk és 10 %-os, 0,75 mm vastag SDS poliakrilamid gélen megfuttattuk [Maniatis és mtsai 1989]. Ezután a gélt ezüsttel megfestettük [Blum és mtsai1987].

3.4. Dinamikus fényszóródás (DLS) mérések

A dynamic light scattering technika oldatban lévő molekulák szerkezeti analízisére (molekula tömeg, méret, töltés) alkalmas. Előnye, hogy kis térfogatú mintát igényel és nem invazív módszer, azaz a mérés során a minta sértetlen marad. Más néven is ismert, például photo-correlation spectroscopy (PCS) vagy quasi-elastic light scattering (QELS). Az oldatban lévő részecskék méret szerinti eloszlását (diszperzitását) adja meg. Ha főként azonos méretű részecskék találhatók az oldatban, akkor monodiszperz, ha több méretpopuláció is található, akkor polidiszperz a rendszer. Ezt az információt a polimerekkel foglalkozó tudományokban, fehérje kristályosításban és fehérje aggregációs vizsgálatokban hasznosítják.

A módszer alapja, hogy amikor a fény a hullámhosszához viszonyítva sokkal kisebb molekulákkal (< 250 nm) ütközik, minden irányban szóródik (Rayleigh szóródás). Ha a fényforrás egy monokróm és koherens fényt létrehozó lézer, akkor a szórt fény intenzitása időfüggő fluktuációt mutat, amit a folyadékban lévő kis molekulák folyamatos Brown mozgása okoz. Az intenzitásfluktuáció idő függését analizálva a molekula diffúziós koefficiense meghatározható, a közeg viszkozitásának ismeretében a hidrodinamikai átmérője is kiszámolható, pontosabban kifejezve egy olyan gömb alakú molekula hidrodinamikai átmérőjét tudjuk kiszámolni, amely az adott oldatban azonos diffúziós koefficienssel rendelkezik, mint a vizsgált molekulánk.

A technika fehérjék konformáció változásának érzékelésére is használható, mivel nagymértékű változás esetén a számolt hidrodinamikai átmérő változik [Dekker és mtsai 2001, Georgieva és mtsai 2008].

A méréseket egy Malvern Nano ZS (modellszám: ZEN3500) típusú géppel végeztük el szobahőmérsékleten. A 20 mM Na-foszfát pH 7,0 pufferben lévő 12,2 µM koncentrációjú tiszta hidrogenázt (DBQQEP) egy 0,22 µm-es szűrőn átszűrtük, hogy a mérést esetlegesen zavaró 220 nm-nél nagyobb részecskéktől megszabaduljunk. A speciális kvarc mintatartó

küvettába 1,5 ml enzimoldatot tettünk. A küvetta felső részén egy vékony cső volt kialakítva, amire gumicsövet illesztve, nitrogént illetve hidrogént tudtunk áramoltatni a küvettába (17. ábra). Felül egy Subaseal gumidugóval zártuk a küvettát, amibe egy tűt szúrtunk, hogy folyamatos legyen a gázáramlás. A gázt, mielőtt a küvettába ért volna vízen buborékoltattuk át, hogy a minta ne száradjon ki a küvettában és egy házilag készített, felmelegített réz-oxid-hidroxid katalitikus oszlopon áramoltattuk át, ami a rajta átfolyó gáz esetleges oxigéntartalmát vízzé redukálta. Egy háromágú csap segítségével egy mozdulattal váltani tudtunk a nitrogén és hidrogén gáz között. A levegő alatti méréseknél a gázáramlás teljesen ki volt kapcsolva.

Az adatokat a készülék gyártója (Malvern Instruments Ltd.) által ajánlott Dispersion Technology Software 5.03 programmal értékeltük ki.



17. ábra A DLS méréshez használt speciális kvarc küvetta.

3.5. Vékonyréteg kísérletek

A vékonyréteg kísérletekhez egy speciális üveglapot használtunk, amibe egy kör alakú, 0,4 mm mély és 36 mm átmérőjű mélyedést políroztak (18. ábra A). A reakcióelegyet (410 µl) ebbe a mélyedésbe pipettáztuk bele oly módon, hogy egy mindenhol egyforma vastagságú (0,4 mm) reakcióréteget kapjunk. A kísérletek során részlegesen tisztított (DPQQ) hidrogenázt és benzil viologén elektron akceptort használtunk. Az üveglapot ezután egy alul és felül Plexi ablakkal zárható anaerob dobozba tettük (18. ábra B). A doboz felső műanyag lapjában egy gumi szeptum található, amibe tűt szúrva a légtércsere során a felesleges gáz távozni tud. A szeptum révén lehetőségünk van különböző anyagok bejuttatására is a légtérbe, illetve a reakcióelegybe. A reakcióelegyet alulról egy fluoreszcens lámpával világítottuk meg, a doboz és a fényforrás között elhelyezett vízréteg biztosította a lámpa hőhatásának csökkentését. A kísérletek mindig szobahőmérsékleten történtek. A minta kiszáradásának

megelőzésére a gázt vízen buborékoltattuk át mielőtt az anaerob dobozba ért volna, és az előzőleg említett oxigénmentesítő oszlopot is alkalmaztuk.

A reakciót egy Sony DCR-PC350E digitális kamerával rögzítettük, a kamera másodpercenként készített egy felvételt. A frontsebesség számolására egy, Dr. Bagyinka Csaba által MATLAB-ban kifejlesztett programot használtunk. A digitális kamera felvételén 6 növekvő kört választottunk ki és képről képre megmértük a körök sugarát, ily módon határoztuk meg a frontsebességet. A kiválasztott pöttyök frontsebességeit átlagoltuk és hibaszámítást is végeztünk.



18. ábra

A vékonyréteg kísérletekhez használt üvegedény (A) és anaerob doboz (B).

A reakciót többféle módon indítottuk, többnyire egyszerűen hidrogénnel fúvattuk át az anaerob doboz légterét. A reakció hidrogén függésének vizsgálatánál és az oszcillációt mutató kísérleteknél nitrogénnel anaerobizáltuk a reakció légterét, majd elzártuk a gázáramlást és adott mennyiségű hidrogént fecskendeztünk be a szeptumon keresztül.

3.5.1. A frontsebesség függése az enzim koncentrációtól

A reakcióelegy 11,56-1000 nM enzimet (2/3-os hígítási sorozatban), 2 mM benzil viologént és 20 mM Na-foszfát pH 7,0 puffert tartalmazott. A reakciót a hidrogén áramlás bekapcsolásával indítottuk.

3.5.2. A frontsebesség függése az elektron akceptor koncentrációtól

A reakcióelegy 500 nM enzimet, 0,38-50 mM benzil viologént (2/3-os hígítási sorozatban) és 20 mM Na-foszfát pH 7,0 puffert tartalmazott. A reakciót a hidrogén áramlás bekapcsolásával indítottuk.

3.5.3. A frontsebesség függése a hidrogén koncentrációtól

A reakcióelegy 500 nM enzimet, 2 mM benzil viologént és 20 mM Na-foszfát pH 7,0 puffert tartalmazott. Az anaerob doboz légterét 10 percig nitrogénnel fúvattuk, majd elzártuk a nitrogént és 0,5-20 ml tiszta hidrogént fecskendeztünk a légtérbe.

3.5.4. A frontsebesség függése a hidrogénion koncentrációtól (pH)

A reakcióelegy 250 nM enzimet, 2 mM benzil viologént és változó pH-jú McIlvaine vagy Britton-Robertson puffert tartalmazott. A reakciót a hidrogén áramlás bekapcsolásával indítottuk.

McIlvaine puffer készítése (pH 2,4-8,0)

0,2 M Na₂HPO₄ 0,1 M citromsav

várt pH	Na ₂ HPO ₄ (ml)	citromsav (ml)	mért pH
2,4	4,24	18,76	2,65
3,0	4,11	15,89	3,28
3,4	5,70	14,30	3,68
4,0	7,71	12,29	4,32
4,4	8,82	11,18	4,74
5,0	10,30	9,70	5,38
5,4	11,15	8,85	5,76
6,0	12,63	7,37	6,33
6,4	13,85	6,15	6,74
7,0	16,47	3,53	7,22
7,4	18,17	1,83	7,62
8,0	19,45	0,55	8,21

A 2. táblázat szerint elkészítettük a különböző pH-jú oldatokat. Egy pH mérő készülékkel (Jenway 3020 pH Meter) ellenőriztük a pH-t, ennek eredménye is a 2. táblázatban látható. A kísérletben a puffert tízszeres hígításban használtuk.

Britton-Robertson puffer készítése (pH 2-12)

Törzsoldatok:	0,04 M ecetsav
	0,04 M foszforsav
	0,04 M bórsav

A törzsoldathoz 5 n NaOH-ot adagoltunk és pH mérő segítségével állítottuk be a pH-t 2től 12-ig 0,5-os léptékkel.

3.5.5. Oszcilláló reakciók

A reakcióelegyben 500 nM hidrogenáz és 2 mM vagy 10 mM benzil viologén volt. A reakcióelegy nem volt pufferelve. Az anaerob doboz légterét 10 percig nitrogénnel fúvattuk, majd elzártuk a gázáramlást és 5 ml illetve 3 ml tiszta hidrogént fecskendeztünk a légtérbe. Egyes kísérleteknél, amikor úgy láttuk, hogy egyensúlyba került a rendszer, további 5 ml tiszta hidrogént fecskendeztünk be.

3.5.6. Vékonyréteg kísérlet gélben

A reakcióelegy 50 nM hidrogenázt, 2 mM benzil viologént és 1,6 % agarózt (Sigma Low Melting) tartalmazott. Az agarózt enyhén felmelegítve, folyékony állapotban kevertük össze a fehérjével és a benzil viologénnel, majd egy kör alakú öntőformába pipettáztuk, így az agaróz megszilárdulása után egy 1 mm vastag, 25 mm átmérőjű, kör alakú gélt kaptunk. A gélt egy műanyag rácsra helyeztük, hogy minden oldalról egyformán érintkezzen a hidrogénnel. A reakciót a hidrogén áramlás bekapcsolásával indítottuk.

3.5.7. Vékonyréteg kísérletek különböző sók jelenlétében

A reakcióelegy 500 nM koncentrációjú hidrogenázt, 2 mM benzil viologént és adott koncentrációjú NaCl, NaF és NaSCN sót tartalmazott 20 mM Tris-HCl pH 7,5 pufferben. A kísérlet során folyamatosan áramlott a hidrogén.

3.6. Modellszámítások

A modell reakció kinetikai egyenleteket Dr. Horváth Dezső és Dr. Tóth Ágota írta le. A kinetikai egyenletek megoldását témavezetőm, Dr. Bagyinka Csaba, Dr. Tóth Ágota és Dr. Horváth Dezső végezte. A differenciálegyenleteket a CVODE illetve a MATLAB programmal oldották meg.

4. Eredmények

4.1. A vékonyréteg kísérleti rendszer

Az Anyagok és módszerek részben részletesen leírtam, milyen eszközökkel és milyen körülmények között (megvilágítás, hőszűrő vízréteg stb.) végeztük a kísérleteket. A reakció indítása többféle módon történhet, az anaerob doboz vákuumozása és hidrogénnel való átfúvatása adja a legpontosabb start időpontot, de a vákuumozás alatt a reakcióelegy gyakran kibuborékolt a speciális üvegedényből. Ezért többnyire egyszerűen hidrogénnel fúvattuk az anaerob dobozt, és a lag fázisokat nem hasonlítottuk össze a kísérletekben.

A hidrogenáz vékonyrétegben vizsgált hidrogénfelvevő reakciójának sajátosságai (19. ábra A, B) a következők:

- a reakció diszkrét pontokból indul, melyek egyre növekvő átmérőjű körökbe mennek át,
- a reakció végén az egyes körök összeérnek, majd az egész reakcióelegy homogén kék színű lesz,
- startpontok a reakciótér bármely pontján kialakulhatnak, s gyakran jelennek meg az edény falánál,
- az egymással kapcsolatba kerülő kék körök érintkező részén fehér vonal figyelhető meg, ami idővel eltűnik,
- a körök növekedési sebessége, vagyis a front haladási sebessége az egyes kísérletekben állandó.

Az oszcilláló reakciók és a Hofmeister anionok jelenlétében végzett kísérletek kivételével a reakció mindig a fenti mintázatot mutatta. Eltérések a redukált elektron akceptor telítési értékében voltak, ezeket a különbségeket azonban ebben a kísérleti elrendezésben nem tudtuk kvantitatívan (abszorpciókülönbség) meghatározni. Némely kísérletben háttérreakció indult be, azaz a növekvő kék körök között elmosódó kék szín jelent meg, ami utána gyorsan erősödött és a körök kiteljesedése előtt bekékült az egész reakciótér. A jelenség pontos magyarázatát nem tudjuk, azonban a reakcióedény alaposabb tisztítása (mosószeres dörzsölés, illetve etanolos lemosás) általában segített ezen a problémán. A Hofmeister sorozat sóinak jelenlétében ez a jelenség felerősödött és az alapos tisztítás sem bizonyult elegendőnek, ezért azt gondoljuk, hogy ilyen esetben egy párhuzamos, nem autokatalitikus folyamat indul be.





A Hyn hidrogénfelvevő reakciójának térbeli mintázata.

A frontsebesség meghatározásához hat különálló növekvő pontot/kört választottunk ki és ezek sugarának időbeli változását mértük (A). Az egymással érintkező frontok között fehér határvonal figyelhető meg (B). A reakció mintázata gélfázisban ugyanolyan jellegzetességeket mutat, mint folyadékban (C).

A mintázat analízisére alkalmazott program hibahatáron belül azonos értékeket adott az egy kísérleten belüli frontsebességekre. Erre a 20. ábrán látható egy példa.





Egy kísérleten belül a hat kiválasztott pont/kör sugarának növekedése a reakció során. A frontsebességet a görbék meredekségéből számoltuk ki.

4.2. A prion típusú autokatalízist igazoló kísérletek

4.2.1. A frontsebesség függése az enzim koncentrációjától

Ezeknél a kísérleteknél azonos koncentrációjú elektron akceptort és változó koncentrációjú hidrogenázt alkalmaztunk. A számolt front haladási sebesség az enzimkoncentráció függvényében a 21. ábrán látható. Ahogy vártuk, az enzim koncentráció növelésével növekszik az autokatalitikus hullám haladási sebessége. A növekedés nem lineáris; a sebesség enzim koncentrációtól való függése négyzetgyökös.

A frontsebesség változása az enzim koncentráció függvényében. A ● és ◆ pontok mérési adatok.
A folyamatos vonal a mérési adatokra illesztett négyzetgyök függvény, az x tengelyt pozitív értéknél (18 nM) metszi. A □ jel a gélfázisban mért frontsebességet jelöli.

4.2.2. Fehérje keresztkötési kísérletek (PICUP)

A kereszkötési kísérleteket a hidrogenáz inaktív (levegőn tartott) és aktiválás alatt lévő (hidrogén alatt tartott) állapotában végeztük.

Keresztkötési kísérletek hidrogenázzal levegőn

A levegőn, oxidált fehérjével elvégzett kísérleteink szolgáltak kontrollként az aktivált fehérjén történő mérésekhez. Ennek eredményét láthatjuk a 22. ábrán.

fény (s)	-	1	1/2	64	1/2	1	2	4	8	16	32	64	128
Ru(bpy) ₃ Cl ₂	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
APS	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

22. ábra

A hidrogenázzal, levegőn történő keresztkötési kísérlet eredménye $(1,43 \ \mu M \ fehérje, \sim 50 \ \mu mol \ foton/s/m^2).$

A kis és nagy alegység detektálható mennyiségű keresztkötött terméke 4 másodpercnyi megvilágítás alatt alakult ki (22. ábra, 8-as minta). 32 másodpercnyi megvilágítás után valamennyi kis és nagy alegység reakcióba lépett egymással és 128 másodperces megvilágításnál is még ugyanazok a keresztkötött termékek vannak jelen, melyek 32 másodperc esetében (22. ábra, 11,12,13-as minta). Ha összehasonlítjuk a 8-13-as mintákban a keresztkötött kis és nagy alegységek sávját, akkor azt látjuk, hogy ez a sáv fokozatosan szélesedik, illetve a 10-es mintától kezdve korábbi helyéhez képest lejjebb helyezkedik el a gélen. Ez a jelenség azzal magyarázható, hogy a növekvő megvilágítási idő hatására a két alegység között több különböző helyen is ki tud alakulni keresztkötés és az így kialakult különböző helyeken kovalensen keresztkötött fehérje komplexek nem pontosan ugyanoda futnak a gélen. 16 másodpercnél (22. ábra, 10-es minta) a nagy alegység alatt kialakult egy másik elmosódott sáv, ami két kis alegység keresztkötött termékének feleltethető meg és az elmosódottság oka ugyanaz, mint az előbb leírt jelenségnek

Keresztkötési kísérletek a hidrogenáz aktív állapotában

A hidrogén alatti inkubálást Bactron IV anaerob kamrában végeztük. A kamrában 5% hidrogént tartalmazó nitrogén gáz volt. A hidrogenáz enzimet 12 óra hosszat a kamra légterében inkubáltuk. Ezen idő alatt az enzim feltételezhetően az aktív állapotába jut [Cammack és mtsai 1994]. A keresztkötéses mérést ezzel az enzimformával végeztük el. Az eredmény a 23. ábrán látható.

23.	ábra

A hidrogenázzal, hidrogén alatt történő keresztkötés eredménye (1,38 μ M fehérje, ~ 51,4 μ mol foton/s/m²).

A gélen két érdekes változás tapasztalható a levegő alatt elvégzett kísérlethez képest:

- Rögtön a kontrollok után, már az első megvilágított minta esetében (1/2 másodpercnél), egy éles csíkot kaptunk a nagy alegység alatt. Ez a csík 1 és 2 másodperces megvilágításnál csak gyengén látható, de a későbbi minták esetében már újra jól megfigyelhető.
- A kis és a nagy alegység keresztkötése később (4 másodperces megvilágítás helyett 8-16 másodperc környékén) alakult ki.

Amennyiben ez a fél másodperces megvilágításnál megfigyelhető csík egy újonnan kialakuló keresztkötött termék, akkor két kis alegység kapcsolódott össze, melyek molekulatömege együttesen $2 \times 34 = 68$ kDa. A megjelenő sáv látszólagos molekulatömege

némileg kisebb, mint a nagy alegységé (64 kDa) és kisebb, mint a két kis alegység összege, ugyanis a keresztkötés miatt kialakuló effektív polipeptidhossz (amit az SDS gélelektroforézis valójában mér) kisebb lesz, mint a két alegység összege (a két kiegyenesített pálcika - az alegység polipeptid lánca - nem a végénél, hanem egymáshoz képest eltolva kapcsolódik össze). Ugyancsak összeegyeztethető ez az elképzelés azzal is, hogy éles csíkot kapunk, ami spontán keresztkötések esetében nem várható. Spontán (vagyis ütközések nyomán létrejövő) keresztkötéseknél ugyanis a fehérjében megtalálható és a fehérje felszínén levő valamennyi reakcióra képes (többnyire tirozinon lévő) oldallánc részt vehet a keresztkötésben. Ha specifikus kötődés alatt (pl. autokatalitikus reakció történik két enzimforma között) jön létre a keresztkötés, akkor abban csak azok az oldalláncok vehetnek részt, amelyek éppen megfelelő távolságra vannak egymástól. Ezért az ilyen típusú keresztkötések esetén nem elmosódott, hanem éles csíkokat várhatunk.

Fény (s)	-	128	-	128	-	1	2	4	8	16	32	64	128
Ru(bpy) ₃ Cl ₂	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
APS	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Töményített hidrogenázzal, hidrogén alatt történő keresztkötési kísérlet eredménye $(3,33 \ \mu M \ fehérje, \sim 50,2 \ \mu mol \ foton/s/m^2).$

Ugyanezt a kísérletet megismételtük megnövelt enzimkoncentrációval, hogy az újonnan megjelenő fehérjesávot jobban lássuk. Az eredmény a 24. ábrán látható. E kísérletben a várakozásnak megfelelően a plusz sáv határozottan felismerhető volt. A kis és nagy alegység keresztkötése (mint az előző kísérletben is) 16 másodperces megvilágítás hatására alakult ki.

Ha megvizsgáljuk az egyes alegységek fogyását, akkor azt látjuk, hogy a levegőn elvégzett kísérlethez viszonyítva a kis alegység sokkal gyorsabban fogyott, mint a nagy alegység, melynek sávja még 128 másodperces megvilágításnál is jól látszik. A kis alegység gyorsabb fogyása magyarázható azzal, hogy a kis alegységek többnyire egymással kapcsolódtak össze (ennek következtében jelent meg a plusz fehérje sáv) és nem a nagy alegységekkel. Hosszabb megvilágítási időknél további keresztkötött termékek is megjelentek a keresztkötött kis és nagy alegységek fölött, melyek valószínűleg legalább kettő nagy alegység és kis alegységek keresztkötött termékei lehetnek. Az idő növekedésével a keresztkötött termékek sávjai szélesednek és elcsúsznak, amit már láttunk a kontroll kísérletnél is.

4.2.3. Konformáció változás vizsgálata dinamikus fényszórással (DLS)

Hidrogenázunkat hidrogén, nitrogén és levegő alatti állapotában vizsgáltuk meg DLS módszerrel. Az eredmény a 25. ábrán látható.

25. ábra

A Hyn hidrodinamikai átmérőjének változása levegő (▲), nitrogén (■) és hidrogén (●) jelenlétében.

Ha átlagot számolunk az eltérő légtér esetén mért hidrodinamikai átmérőkre, akkor azt látjuk, hogy nem történt számottevő változás (26. ábra). Ez azt jelenti, hogy nincs nagymértékű konformációs változás az enzim aktiválása folyamán, azonban nem zárja ki egy minimális konformáció változás lehetőségét. A hidrogenázok alapvetően merev szerkezetű fehérjék, és kismértékű aminosav oldallánc átrendeződés már elegendő lehet az aktiválásukhoz.

26. ábra A 25. ábrán látható mérési adatok átlaga.

4.2.4. Különböző Hofmeister sorozatbeli sók hatása a frontsebességre

A vékonyréteg kísérletek során tapasztalt mintázat jellegzetességeit már korábban leírtam, és ott tettem egy megjegyzést, hogy néhány esetben háttér reakció indult be az autokatalitikus mintázattal párhuzamosan. Ezt a jelenséget általában a nem megfelelő tisztításnak tulajdonítottuk, de a különböző sók jelenlétében végzett kísérletek rávilágítottak, hogy nem csak az elégtelen tisztítás a jelenség oka.

Már alacsony sókoncentrációnál megfigyeltük, hogy a reakció először elkülönülő pontokból indult el, majd kialakul egy halványkék folt, amely aztán gyorsan sötétedik és elterjed a reakciótérben.

Eredmények

Azt tapasztaltuk, hogy mindhárom típusú (kozmotróp, kaotróp és semleges) anion esetén alapvetően ugyanaz a mintázat alakul ki, de vannak eltérések. NaSCN-ot tartalmazó reakcióelegyben a só koncentrációjának növelésével párhuzamosan egyre kevesebb startpont alakult ki és inkább az elegy egyidejű, homogén besötétedése volt a jellemző.

A különböző sók jelenlétében mért frontsebességek a 27. ábrán láthatóak.

27. ábra

Különböző sók hatása a frontsebességre (▲: NaCl, ●: NaF, ■: NaSCN). A kaotróp NaSCN már alacsony koncentrációban jelentősen lecsökkentette a frontsebességet.

4.3. A reakció mintázatot befolyásoló körülmények vizsgálata

4.3.1. A frontsebesség függése az elektron akceptor koncentrációtól

Az elektron akceptor koncentrációját 50 mM-tól 2/3-os hígítással 0,39 mM-ig változtattuk és az enzim koncentráció végig 500 nM volt. Az eredmény a 28. ábrán látható. A

Eredmények

benzil viologén koncentrációjának növelése gátló hatással volt az autokatalitikus reakcióra, ami azt jelzi, hogy az elektron akceptor kölcsönhatásba lép az autokatalizátorral.

Az elektron akceptor hatása a frontsebességre. A pontok • mérési adatok.

4.3.2. A frontsebesség függése a hidrogén koncentrációtól

Ezekben a kísérletekben egy adott benzil viologén és enzim koncentrációt használtunk és a légteret levegőről először nitrogénre cseréltük le. Fecskendő segítségével juttattuk a megfelelő mennyiségű hidrogént a légtérbe. Sajnos nem tudtunk széles hidrogénkoncentráció tartományt megvizsgálni, mert a hidrogén mennyiség egy bizonyos szint alá csökkentése a telítési redukált elektron akceptor mennyiségét is annyira lecsökkentette, hogy vizuálisan nem lehetett értékelni a felvételeket. Az eredményeket a 29. ábra tartalmazza.

A frontsebesség változása a légtér hidrogén koncentrációjának függvényében. A ▲ pontok mérési adatok. A folyamatos fekete vonal a folyamatos hidrogén áramlás mellett mért frontsebességet jelöli.

4.3.3. A frontsebesség függése a hidrogénion koncentrációtól (pH)

Kétféle puffer rendszert használtunk a kísérletek során. A McIlvaine rendszer a 2,4-től 8,0-ig terjedő pH tartományt fedi le és citromsavat és Na₂HPO₄-ot tartalmaz. A Britton-Robertson puffer ecetsav, foszforsav és bórsav felhasználásával készül és 2-től 12-ig állítható a pH-ja. Mindkét puffer esetén azt tapasztaltuk, hogy pH 6 alatt, illetve pH 11 felett a reakció felvétele értékelhetetlen a program számára. Főként háttér reakciót láttunk, és a redukált benzil viologén mennyisége annyira kevés volt, hogy a színváltozást szabad szemmel is nehezen lehetett követni.

A hidrogénion koncentráció (pH) hatása a frontsebességre (●: McIlvaine puffer, ●: Britton-Robertson puffer).

A programmal kiértékelt eredményeket a 30. ábra mutatja. Látható, hogy a szélsőséges pH-knál fellépő probléma ellenére elég sok pH értéknél sikerült megmérni a frontsebességet és a kétféle puffer rendszerrel a frontsebesség hasonló változást mutat a pH függvényében.

4.3.4. Kísérletek gélfázisban

A reakció 1,6 %-os agaróz gélben ugyanazt a mintázatot mutatta, mint folyadék fázisban, elkülönülő pontok, majd ezekből kék körök alakultak ki a reakció során (19. ábra C). A számolt front haladási sebesség a 21. ábrán látható.

4.4. Oszcilláció

Az autokatalitikus reakciók bizonyos körülmények között oszcillációt mutatnak. Hidrogenázunk esetében ez úgy nyilvánulna meg, hogy az enzim a hidrogén felvevő és hidrogén fejlesztő irányú aktivitásának megfelelően redukálná, illetve oxidálná az elektron akceptort, azaz kék és színtelen mintázat egymással váltakozva alakulna ki.

A Hyn hidrogenáz kétféle irányú aktivitásának eltérő a pH optimuma. A 10. ábrán látható, hogy hidrogén felvevő aktivitás pH optimuma 9-10-es pH körül van, a hidrogén fejlesztő aktivitásé pedig 4-5-ös pH körül. Ez azt jelenti, hogy pH változás esetén az enzim a pillanatnyi pH-tól függően az egyik vagy másik irányban működik nagyobb hatékonysággal, de természetesen a szubsztrátok (hidrogén gáz, elektron akceptor) koncentrációja is meghatározó tényező. Az enzim működése során a hidrogén oxidálásából hidrogén ionok (is) keletkeznek, ami a reakcióelegy pH-ját eltolja a savas irányba, ha nincs jelen puffer. Ezt az effektust használtuk ki ezekben a kísérletekben.

31. ábra

A Hyn hidrogenáz oszcilláló reakciója. Az egyes pillanatképek (A-L) időrendben egymást követik.

A puffer nélküli reakcióelegyet előbb nitrogénnel fúvattuk, majd a gázáramlást elzártuk, és a zárt anaerob dobozba kis mennyiségű hidrogént fecskendeztünk. Amikor folyamatosan

áramlik a hidrogén (nagy a hidrogén koncentráció) az enzim főleg oxidálja a hidrogént és a keletkező protonok hatását a reakcióelegyben lévő puffer semlegesíti.

Mivel autokatalitikus reakcióról van szó, az autokatalizátor enzimforma eloszlása a reakciótérben a reakció elején nem homogén (ez a térbeli mintázat, az autokatalitikus hullám létrejöttének oka), de pufferelt közegben az autokatalitikus hullám belsejében már kialakul az egyensúlyi helyzet. Nem pufferelt közegben ezt az egyensúlyt megzavarja a lokális pH változás, ami a reakció kinetikai állandóit megváltoztatja. A pH változás az autokatalitikus térrész közepén a legnagyobb, olyannyira, hogy a kinetikai állandók a térrész közepén a reakciót az ellenkező irányba hajtják. Ezáltal, az előbbivel ellentétes reakcióban egy újabb ellentétes fázisú autokatalitikus hullám alakul ki. Ennek belsejében a pH változás ellentétes irányú lesz, ami egy újabb oszcilláció kezdetét jelenti. Az autokatalitikus reakció lassú, ezért makroszkópikusan megfigyelhető (perces periódus idejű) oszcillációt várhatunk, ami egyre csillapodó amplitúdóval az egyensúly beálltáig zajlik.

32. ábra

A Hyn hidrogenáz oszcilláló reakciója. Az egyes pillanatképek (A-I) időrendben egymást követik.

A 31. és 32. ábrán láthatóak két ilyen kísérletből származó pillanatképek. Sokféle oszcillációs mintázatot tapasztaltunk a kísérletek során.

Egyes esetekben a reakciótér homogén bekékülése előtt, a még növekvő kék körök közepén jelentek meg fehér foltok, melyek szintén növekedtek, majd ezek közepén újabb kékülés kezdődött. Más esetekben a reakciótér teljesen bekékült, és egy kis idő múlva főként a szélétől egy vagy több színtelen hullám indult el (31. és 32. ábra D). Ezek a hullámok haladásuk közben néha ütköztek egymással vagy kettéváltak (31. ábra G-L). Gyakran láttuk azt, hogy a kék reakcióelegy szélén kicsi fehér hullám (volt olyan hogy kettő) halad körbe (31. ábra I-L; 32. ábra H-I).

4.5. Modellszámolások

A bevezetőben már ismertetett autokatalitikus modellt úgy módosítottuk, hogy az aktiválás lépései és az autokatalitikus lépés megmaradtak, ugyanakkor a modell figyelembe veszi az újabb kísérleti eredményeket, nevezetesen, hogy a front haladási sebesség a teljes enzim koncentráció négyzetgyökével arányos, és hogy a frontsebesség csökken, ha az elektron akceptor koncentrációja növekszik. Az első megfigyelés alapján az autokatalitikus lépés az enzim koncentrációjára nézve egy másodrendű reakció, a második megfigyelés pedig arra utal, hogy az elektron akceptor közvetlen kölcsönhatásban van az autokatalizátorral.

Ezekben a kísérletekben a hidrogén áramlás folyamatos volt a reakció során, azaz a hidrogén koncentrációt konstansnak vehetjük, ezért az új modellekben nem szerepel a hidrogénkötő lépés. Az enzimciklus során az enzim oxidációs állapotának vissza kell állnia a kiindulási oxidációs állapotba, ezért legalább három enzimforma alkotja az enzimciklust.

Az 1. modell, melyben az autokatalitikus lépést az enzimcikluson belül helyeztük el.

Két modellt vizsgáltunk meg, melyek között az alapvető különbség az, hogy az E_2 forma E_3 -ba történő autokatalitikus konverziója az enzimcikluson belül (első modell 33. ábra), vagy azon kívül (második modell 35. ábra) helyezkedik el.

4.5.1. 1. modell (autokatalitikus lépés az enzimcikluson belül)

$$\begin{split} &Az \ els{\tilde{o}} \ modell \ (33. \ \acute{a}bra) \ egyenletei: \\ &\partial [E_1]/\ \partial t = D_1 \ \nabla^2 \ [E_1] \ - \ k_{1f}[E_1] \\ &\partial [E_2]/\ \partial t = D_2 \ \nabla^2 \ [E_2] \ + \ k_{1f}[E_1] \ - \ k_{2af}[E_2][E_3] \ - \ k_{2f}[E_2] \ + \ k_{2b}[E_3] \ + \ k_{cf}[E_4][M_o] \\ &\partial [E_3]/\ \partial t = D_3 \ \nabla^2 \ [E_3] \ + \ k_{2af}[E_2][E_3] \ + \ k_{2f}[E_2] \ - \ k_{2b}[E_3] \ - \ k_{3f}[E_3][M_o] \\ &\partial [E_4]/\ \partial t = D_4 \ \nabla^2 \ [E_4] \ + \ k_{3f}[E_3][M_o] \ - \ k_{cf}[E_4][M_o] \\ &\partial [M_o]/\ \partial t = D_o \ \nabla^2 \ [M_o] \ - \ k_{3f}[E_3][M_o] \ - \ k_{cf}[E_4][M_o] \\ &\partial [M_r]/\ \partial t = D_r \ \nabla^2 \ [M_r] \ + \ k_{3f}[E_3][M_r] \ + \ k_{cf}[E_4][M_r]. \end{split}$$

Az E_i a különböző enzimformák változatait, az M_o és M_r az elektron akceptor oxidált illetve redukált formáit jelölik. Az *in vivo* kísérletekben az M_r frontsebességét mértük. A reakció axiális szimmetriájú, ezért egy dimenzióra írtuk fel az egyenleteket és dimenzió nélküli változókat vezettünk be. A különböző enzimformák diffúziós állandói azonosak (D₁=D₂=D₃=D₄), a benzil viologén diffúziója lehet kicsit gyorsabb, de az oxidált és redukált elektron akceptor diffúziós állandója azonos (D_o=D_r). A szubsztrát koncentráció az enzimkoncentrációhoz hasonlítva sokkal nagyobb, ezért eloszlásának szerepe a reakciófront viselkedésében és haladási sebességében jelentéktelen, azt főként a különböző enzimformák diffúziója szabja meg.

Mivel a diffúziós konstansokat ugyanakkorának vettük, a távolság skálát $\xi = (k_{2a}E_T/D)^{1/2}x$ kifejezéssel írhatjuk le. Az időt (t) $\tau = k_{2af}E_Tt$ formába írtuk át. A koncentrációkat a totál enzim koncentráció (E_T) százalékában adtuk meg: $e_i = [E_i]/E_T$, $m_o = [M_o]/E_T$, $m_r = [M_r]/E_T$.

Így a következő egyenleteket írhatjuk fel:

$$\begin{split} \partial e_1 / \partial \tau &= \partial^2 e_1 / \partial \xi^2 - \kappa_{1f} e_1 \\ \partial e_2 / \partial \tau &= \partial^2 e_2 / \partial \xi^2 + \kappa_{1f} e_1 - e_2 e_3 - \kappa_{2f} e_2 + \kappa_{2b} e_3 + \kappa_{cf} e_4 m_c \\ \partial e_3 / \partial \tau &= \partial^2 e_3 / \partial \xi^2 + e_2 e_3 + \kappa_{2f} e_2 - \kappa_{2b} e_3 - \kappa_{3f} e_3 m_o \\ \partial e_4 / \partial \tau &= \partial^2 e_4 / \partial \xi^2 + \kappa_{3f} e_3 m_o - \kappa_{cf} e_4 m_o \\ \partial m_o / \partial \tau &= \partial^2 m_o / \partial \xi^2 - \kappa_{3f} e_3 m_o - \kappa_{cf} e_4 m_o \\ \partial m_r / \partial \tau &= \partial^2 m_r / \partial \xi^2 + \kappa_{3f} e_3 m_o + \kappa_{cf} e_4 m_o, \end{split}$$

Eredmények

ahol $\kappa_i = k_i/(k_{2af} E_T)$ az elsőrendű kinetikai állandókra (κ_{1f} , κ_{2f} , κ_{2b}) és $\kappa_i = k_i/k_{2af}$ a másodrendű kinetikai állandókra (κ_{3f} , κ_{cf}).

A számolások megkönnyítése érdekében néhány reakciót egyszerűsítettünk. Elsősorban a frontsebesség alakulása érdekel minket, így az E_1 lassú E_2 formába alakulása ($E_1 \rightarrow E_2$) elhanyagolható, a κ_{1f} állandót ezért nullának vettük. Az *in vivo* kísérletek alapján az E_2 forma E_3 formába történő nem autokatalitikus átalakulása ($E_2 \rightarrow E_3$) lassú folyamat és nem eredményez frontot, ezért a κ_{2f} állandót is nullának vettük.

Az autokatalízis során az M_o koncentrációcsökkenése azonos sebességgel történik, mint az E₃ koncentrációjának növekedése, ezért a reakció front közelében az M_o koncentrációja lényegében állandónak vehető. Az E₃ visszaalakulása E₂ formába (E₂ \leftarrow E₃) nem különböztethető meg az E₃ forma E₄, majd E₂ formába alakulásától (E₃ \rightarrow E₄ \rightarrow E₂), ezért a κ_{2b} állandót nullának vettük.

A modellek alapján számolt frontsebességek az enzimkoncentráció függvényében (piros: 1. modell, zöld: 2. modell).

 κ_{3f} állandó értékét úgy állítottuk be, hogy a számolás eredménye a kísérletileg megfigyelt enzim koncentráció küszöbértékével megegyezzen (18 nM).

A reakció kezdeti értékei a $\tau=0$ időpontban, nulla fluxus peremfeltétel és 0,1 rácspont felbontás esetén a következők: 0-tól 10-ig terjedő térbeli tartományban $E_2=(1-p)E_T$, $E_3=pE_T$ és minden más enzim komponens (E_1 , E_4) nulla, 10-től 1000-ig terjedő térbeli tartományban $E_2=E_T$ és minden egyéb enzimkomponens (E_1 , E_3 , E_4) nulla. A p paramétert 0,001 és 1 között változtattuk, de nem volt különösebb hatása a frontsebességre.

A modell alapján számolt frontsebesség-enzim koncentráció függés két eltérő paraméter beállítással a 34. ábrán (piros), a frontsebesség-elektron akceptor koncentráció függés pedig három eltérő enzim koncentráció mellett a 36. ábrán (piros) látható.

4.5.2. 2. modell (autokatalitikus lépés az enzimcikluson kívül)

A második modell egyenletei:

$$\begin{array}{l} \partial \ [E_1]/\ \partial t = D_1\ \nabla^2\ [E_1] - k_{1f}[E_1] \\ \partial \ [E_2]/\ \partial t = D_2\ \nabla^2\ [E_2] + k_{1f}[E_1] - k_{2af}[E_2][E_3] - k_{2f}[E_2] + k_{2b}[E_3] \\ \partial \ [E_3]/\ \partial t = D_3\ \nabla^2\ [E_3] + k_{2af}[E_2][E_3] + k_{2f}[E_2] - k_{2b}[E_3] - k_{3f}[E_3][M_o] + k_{cf}[E_5] \\ \partial \ [E_4]/\ \partial t = D_4\ \nabla^2\ [E_4] + k_{3f}[E_3][M_o] - k_{4f}[E_4][M_o] \\ \partial \ [E_5]/\ \partial t = D_5\ \nabla^2\ [E_5] + k_{4f}[E_4][M_o] - k_{cf}[E_5] \\ \partial \ [M_o]/\ \partial t = D_o\ \nabla^2\ [M_o] - k_{3f}[E_3][M_o] - k_{4f}[E_4][M_o] \\ \partial \ [M_r]/\ \partial t = D_r\ \nabla^2\ [M_r] + k_{3f}[E_3][M_r] + k_{4f}[E_4][M_r]. \end{array}$$

35. ábra

A 2. modell, melyben az autokatalitikus lépést az enzimcikluson kívül helyeztük el.

Az első modell esetében is alkalmazott helyettesítésekkel: $\partial e_1 / \partial \tau = \partial^2 e_1 / \partial \xi^2 - \kappa_{1f} e_1$ $\partial e_2 / \partial \tau = \partial^2 e_2 / \partial \xi^2 + \kappa_{1f} e_1 - e_2 e_3 - \kappa_{2f} e_2 + \kappa_{2b} e_3$ $\partial e_3 / \partial \tau = \partial^2 e_3 / \partial \xi^2 + e_2 e_3 + \kappa_{2f} e_2 - \kappa_{2b} e_3 - \kappa_{3f} e_3 m_0 + \kappa_{cf} e_5$ $\partial e_4 / \partial \tau = \partial^2 e_4 / \partial \xi^2 + \kappa_{3f} e_3 m_0 - \kappa_{4f} e_4 m_0$
$$\begin{split} \partial e_5 &/ \partial \tau = \partial^2 e_5 / \partial \xi^2 + \kappa_{4f} \, e_4 \, m_o - \kappa_{cf} \, e_5 \\ \partial m / \partial \tau &= \partial^2 m_o / \partial \xi^2 - \kappa_{3f} \, e_3 \, m_o - \kappa_{4f} \, e_4 \, m_o \\ \partial m_r / \partial \tau &= \partial^2 m_r / \partial \xi^2 - \kappa_{3f} \, e_3 \, m_o - \kappa_{4f} \, e_4 \, m_o. \end{split}$$

A számolások során az E1 \rightarrow E2 és a nem autokatalitikus E2 \rightarrow E3 lépést nem vettük figyelembe, ahogy az első modellnél sem ($\kappa_{1f} = 0$ és $\kappa_{2f} = 0$).

A frontsebesség alakulása a benzil viologén koncentráció függvényében a modellek alapján (piros: 1. modell, zöld: 2. modell).

Ha az autokatalízis az enzimcikluson kívül történik, akkor nem az autokatalizátor E_3 forma fogyásának kinetikai állandója (κ_{3f}) az, ami meghatározza E_3 koncentrációját, hanem a cikluson belül a kinetikai állandók aránya. Ennél a modellnél az $E_2 \leftarrow E_3$ átalakulás kinetikai állandóját nem vettük nullának ($\kappa_{2b}\neq 0$). A sebességi állandókat az első modellhez hasonlóan úgy állítottuk be, hogy a számolás eredménye a kísérletileg megfigyelt enzim koncentráció küszöbértékével megegyezzen. A kezdeti körülmények az első modell kezdeti körülményeivel megegyeztek.

Ebben a modellben két különböző hidrogénkötő lépésnek kell lennie, egyiknek az enzimcikluson belül, a másiknak azon kívül.

Az ezzel a modellel számolt frontsebesség-enzim koncentráció függés a 34. ábrán (zöld), a frontsebesség-elektron akceptor koncentráció függés három eltérő enzim koncentrációnál a 36. ábrán (zöld) látható.

5. Az eredmények megvitatása

A korábbi eredmények arra utaltak, hogy a *Thiocapsa roseopersicina* membránkötött Hyn hidrogenázának a hidrogénfelvevő reakciója autokatalitikus folyamat [Bagyinka és mtsai 2003, Ősz és mtsai 2005a, Ősz és mtsai 2005b]. A reakció küvettában és vékonyrétegben is térbeli mintázatot mutatott, ami az autokatalitikus reakciókra jellemző.

A mintázat másik lehetséges oka az autokatalitikus reakció jelenlétén kívül a reakcióelegy alkotóinak nem homogén eloszlása lehet. A benzil viologén vízoldékony vegyület, egyenlőtlen eloszlása így kizárható. A Hyn hidrogenáz vízoldékony fehérje, ugyanakkor mivel membrán asszociáltan helyezkedik el a sejtben, bizonyos fokú aggregáció elképzelhető. Ha az elkülönülő spontán reakció startpontokat aggregálódott hidrogenáz fehérjék alkotnák, akkor a front haladási sebessége nem lenne állandó, mivel a reakció csakis a startpontok közepén zajlana, és a keletkező redukált festék kifelé irányuló illetve az oxidált festék befelé irányuló diffúziója határozná meg a frontsebességet és ez a diffúzió a reakció előrehaladtával (a pötty növekedésével) egyre jobban lassulna. Az összes kísérletünkben állandó frontsebességet tapasztaltunk, ezért a fehérje aggregációt, mint a mintázat okát kizárhatjuk. További lehetőség a hidrogén egyenlőtlen eloszlása. Kísérleteinkben a reakció elején az anerob doboz légterében levegő van, mely lassan kicserélődik a hidrogénnel, de a vákuumpumpa alkalmazásával pillanatok alatt hidrogénre cserélt légtérben ugyanilyen mintázatot mutatott a reakció. A hidrogén diffúziója sem eredményezhet nem homogén eloszlást, mivel egy ilyen vékony folyadékrétegben 16 másodperc alatt a hidrogén egyenletesen eloszlik a mintában a diffúziós koefficiense alapján számolva, ami vízben 5 x 10⁻⁵ cm²/s [Ferrel és mtsai 1967]. Ha a hidrogén folyadékrétegbe jutása nem egyenletesen, hanem csatornákon keresztül történne, akkor a front haladási sebessége nem lenne állandó, ugyanolyan indokok alapján, mint amivel az aggregált hidrogenázok esetében érveltünk.. Lezárt üvegben, a reakció előtt alaposan felrázva a reakcióelegyet, s így egyenletesen eloszlatva a hidrogént, szintén mintázat alakult ki.

Az 1,6 %-os agaróz gélben lejátszódó reakció is mintázatot mutatott, a front haladási sebesség állandó volt és jelentősen nem csökkent a folyadékban történő reakcióhoz hasonlítva (19. ábra C, 21. ábra □), ezért a konvekció szerepét kizárhatjuk ezekben a kísérletekben.

A fent tárgyalt lehetőségek kizárásával belátható, hogy a vékonyréteg kísérletekben kialakuló mintázat oka csakis egy, az enzim aktiválása vagy működése során történő autokatalitikus reakció lehet. A hidrogenáz oszcilláló reakciója is egy fontos bizonyíték erre.

Az autokatalitikus folyamatok gyakran oszcilláló jelenségek kialakulását okozzák, melyek keverés nélkül, vékonyrétegben vizsgálva különféle periodikus mintázatokat hoznak létre. Jól ismert kémiai oszcillációs reakció a Belouszov-Zsabotyinszkij reakció, melyben a bromát és a cérium (III) közötti reakcióban a bromátion autokatalitikus oxidációja történik és ez vékonyrétegben mintázatok kialakulását okozza (37. ábra). A mintázat többféle lehet, koncentrációs körök, vonuló hullámok, spirálok alakulhatnak ki, a közegtől függően. A hidrogenáz esetében mindenféle mintázat előfordult (körök, hullámok és spirálok), s bár egyelőre még nem tudtuk befolyásolni, hogy egy adott kísérletben milyen mintázat jelenjen meg, az oszcilláció jelensége mégis egy igen fontos bizonyíték az autokatalitikus reakció létezésére, és ismereteink szerint ez az első önmagában oszcilláló enzim.

37. ábra

Kémiai hullámok a Belouszov-Zsabotyinszkij reakcióban [Epstein és mtsai 1996].

A mintázat mellett megjelenő háttér reakció mögött (amikor egy elmosódó kék folt jelenik meg a növekvő körök mellett és homogénen bekékül a reakciótér) egy nem autokatalitikus folyamat állhat, bár eleinte a reakcióedény nem megfelelő tisztítását gondoltuk a kiváltó oknak. Ez utóbbinak is van igazságtartalma, mert az előző kísérletben használt és már aktív hidrogenáz egy része kitapadhat a reakcióedény aljára és egyszerű desztillált vizes lemosással nem biztos, hogy teljesen eltávolítható. Sokszor azonban a legalaposabb tisztítás sem volt elegendő. Az enzimkoncentráció csökkentésével is megszüntethető volt a háttér reakció, és a hidrogénion koncentráció és a Hofmeister sorozatból származó anionok hatásának vizsgálatánál már egyértelműen látszott, hogy nem csak egy tisztítási problémáról van szó. Mindhárom típusú só esetén, illetve erősen savas és bázikus pH értékeknél erősödött ez a jelenség, a kaotróp NaSCN hatására pedig szinte teljesen eltűnt a mintázat, és a reakcióelegy egyidőben, egységesen bekékült, ahogy azt egy nem autokatalitikus enzimreakciónál várnánk. Az enzim modellekbe ezért beillesztettünk egy nem autokatalitikus lépést is, amivel a jelenség magyarázható, azonban a frontsebesség számolásánál ezt a reakciót nem vettük figyelembe, mert az enzimkoncentrációt illetve az elektron akceptor koncentrációt változtató kísérletekben mindig kiküszöböltük a háttér reakciót.

Az irodalmi áttekintésben számba vettem az autokatalízis lehetséges mechanizmusait, melyek a Hyn esetén szóba jöhetnek. A termékaktiválás és foszforiláz típusú autokatalízis lehetőségét akkor kizártam. A redukált elektron akceptor, mint termék a korábbi beoltási kísérletekben hatástalannak bizonyult. Az enzimkoncentráció változtatásával kapott újabb eredmények pedig egyértelműen egy autokatalizátor fehérje forma létezésére utalnak. A hidrogénion koncentráció, mint termék hatását a frontsebességre lehetőségünk volt megvizsgálni, azonban nehezen értelmezhető eredményt kaptunk (30. ábra). A hidrogénion szerepe kettős, mivel a reakció során egyrészt, mint termék keletkezik, másrészt a fehérje szerkezetére közvetlenül is hatással van. A Hyn küvettában mért hidrogén felvevő és hidrogén fejlesztő irányú aktivitásának pH optimuma a 10. ábrán látható. A hidrogén felvevő aktivitás optimuma pH 9,5 körül van. Kísérleteinkben pH 7,5 és pH 9 között minimumot mutatott a frontsebesség. A pH 5,6 alatti és pH 11 feletti kísérleteknél a mintázat szinte teljesen eltűnt, csak a (nem autokatalitikus) háttér reakciót láttuk. pH 6 körül és alatt a hidrogénionok koncentrációja magas, ezért azt várnánk, hogy a reakció nem indul el, vagy legalábbis lassul. Ezzel ellentétben a reakció meglehetősen magas frontsebességgel haladt. Azt gondoljuk, hogy itt a hidrogénion koncentráció fehérjeszerkezetre gyakorolt hatása nyilvánul meg.

A foszforiláz típusú autokatalízist a hidrogenáz esetében úgy lehetne elképzelni, hogy az elektronnal rendelkező autokatalizátor enzimforma redukálja a nem autokatalizátor enzimformát. A hidrogenázok kis alegységén találhatóak az elektronszállításban szerepet játszó vas-kén kockák, ezért a fehérje keresztkötési kísérletek, melyek szerint két kis alegység hat kölcsön egymással, látszólag ezt a típusú autokatalízist valószínűsítik. Ha végiggondoljuk azonban, a két enzimforma ilyen kölcsönhatásának eredménye semmiképpen nem lehet azonos az autokatalizátor enzimformával, mert az a kölcsönhatás közben átad egy elektront, vagyis önmaga is változáson megy keresztül.

Ezek után a prion típusú autokatalízis tűnik a legvalószínűbbnek, aminek során fehérjefehérje kölcsönhatás és indukált konformáció változás történik. A fehérje keresztkötési kísérletekben sikerült egymással kölcsönható kis alegységeket kimutatni (24. ábra), de a konformáció változás detektálását célzó DLS mérések nem hoztak egyértelmű eredményt (25. és 26. ábra), ami azért nem zárja ki egy minimális fehérjeszerkezet változás (néhány aminosav átrendeződése) lehetőségét, melynek során a fehérje külső mérete nem változik meg. Nehéz meghatározni azt a minimális hidrodinamikai átmérő változást, amelyhez már biztosan fehérje konformáció változás köthető. Egy hasonló, fehérje konformációt vizsgáló tanulmányban egy négy alegységes fehérje konformáció változását követték NaCl jelenlétében [Dekker és mtsai 2001]. A számolt hidrodinamikai átmérő a DLS kísérlet során körülbelül 20 %-kal változott meg és a szerzők a tetramer fehérje monomerjeinek rotációs elmozdulását és a hidrofób kölcsönhatások erősödése miatt a szerkezet tömörebbé válását feltételezték. Hidrogenáz esetében elegendő lehet néhány aminosav átrendeződése, ami megszünteti a proton-, vagy elektronáramlás gátját. Egy kismértékű konformáció változás lehetősége mellett szól a Hofmeister sorozat anionjainak frontsebességre gyakorolt hatása is (27. ábra). A kozmotróp NaF, ami a fehérje natív szerkezetét stabilizálja, és ez által az enzimek aktivitását általában növeli, az autokatalitikus reakcióra a semleges NaCl-hoz hasonló hatással volt és nem növelte jelentősen a frontsebességet, sőt 100 mM feletti koncentrációban inkább lassította azt. A NaF feltehetően a hidrogenáz levegőn kialakult konformációját stabilizálja, amely az eredmények szerint nem azonos azzal a fehérje konformációval, amely a frontsebesség meghatározásában (az autokatalitikus lépésben) részt vesz. A kaotróp sók a fehérje szerkezetet instabilizáló hatásuk miatt a konformáció változást elősegítik, ezért a hidrogenáz esetében azt vártuk, hogy a frontsebesség növekedni fog NaSCN jelenlétében. Ezzel szemben a kaotróp só már alacsony koncentrációnál a frontsebesség drasztikus csökkenését, magasabb koncentrációban pedig az autokatalitikus mintázat szinte teljes eltűnését okozta, azaz a hidrogenáz szerkezetének túlzott lazulása kimondottan gátolja az autokatalitikus lépést. A fehérje keresztkötési kísérletek, a DLS mérések és a különféle sók jelenlétében mért vékonyréteg kísérletek alapján az autokatalitikus lépés során két enzimforma hat kölcsön és az autokatalizátor forma indukálhatja a másik, nem autokatalizátor forma kismértékű konformáció változását.

Az autokatalitikus reakcióban részt vevő partnerek természetére nézve a korábbi eredmények azt valószínűsítették, hogy két enzimforma hat kölcsön egymással. A beoltási kísérletek aktivált enzimmel, vagy a reakción már átesett reakcióeleggyel sikeresek voltak, új reakció startpontok alakultak ki. Az egyik termék, a redukált benzil viologén beoltása nagy koncentrációban szintén indított ugyan startpontot, azonban a reakcióelegyben lévő benzil viologén koncentrációhoz hasonló mennyiségű redukált festék már hatástalan volt. Ez utóbbit igazolta az a kísérlet is, melyben a reakcióelegyben gerjesztő lézer segítségével pontokban redukálták a benzil viologént, de új startpontok nem alakultak ki. A másik termék, a proton autokatalitikus szerepe kizárható, mivel a reakció pufferelt volt így mindig volt jelen proton.

Egy hidrogenáz forma, mint autokatalizátor szerepét bizonyítja, hogy kísérleteinkben az enzimkoncentráció növelésével növekedett a front haladási sebesség (21. ábra). A függés egy négyzetgyök függvénnyel írható le. A mérési pontokra illesztett négyzetgyök függvény az x tengelyt pozitív értéknél metszi (18 nM), azaz létezik egy enzim koncentráció küszöbérték, mely alatt a reakció soha nem fog elindulni. Egy ilyen küszöbérték meglétét már a korábbi, egyszerűsített enzim modellszámolásokban igazolták [Bagyinka és mtsai 2003, Ősz és mtsai 2005b].

Az oxidált elektron akceptor koncentrációjának növelésével a frontsebesség csökkent (28. ábra). A frontsebesség csökkenése csak úgy állhat elő, ha a hidrogenáz kölcsönhatása az elektron akceptorral csökkenti az autokatalitikus enzimforma mennyiségét. A hidrogenáz feltételezhetően a disztális FeS kockán keresztül lép kölcsönhatásba az elektron akceptorral.

A hidrogén az enzim aktiválásához szükséges ugyan, de mint szubsztrát az eredmények szerint nem játszik jelentős szerepet magában az autokatalitikus reakcióban, bár viszonylag szűk koncentráció tartományban tudtuk csak megvizsgálni a hatását (29. ábra). Nehezítette a kiértékelést, hogy alacsony hidrogén mennyiség esetén a keletkező redukált elektron akceptor mennyisége annyira lecsökkent, hogy a reakció felvétel kiértékelhetetlen volt.

A modellek alapján végzett számolások mindkét modell esetében a frontsebesség négyzetgyökös függését mutatták az enzimkoncentrációtól (34. ábra). A számolások szerint meghatározható egy adott enzimkoncentráció (küszöbérték), ami alatt a reakció soha nem indul el. Ilyen küszöbértéket a mérési pontok is mutatnak (21. ábra). A modellekkel a háttér reakció szimulálható úgy, hogy a nem autokatalitikus reakció kinetikai állandóját nullától eltérő értékre állítjuk.

A frontsebesség elektron akceptor koncentrációjától való függése az *in silico* kísérletekben egy szűk koncentráció tartományban mutatott nagymértékű csökkenést, míg az *in vivo* kísérletekben ez a csökkenés szélesebb koncentráció tartományban történt (36. és 28. ábra).

Összességében elmondható, hogy mindkét modell analízise többé-kevésbé a mérési eredményekhez hasonló jellemzőket mutatja, és nem erősíti meg, de nem is cáfolja azt a feltevésünket, hogy az autokatalitikus lépés az enzimcikluson belül történik.

Joggal vetődhet fel a kérdés, hogy *in vivo* a *Thiocapsa roseopersicina*-ban hogyan működik a hidrogenáz és hogy miféle előnye származhat a baktériumnak egy autokatalitikus mechanizmussal működő enzimből. Erre vonatkozó kísérletek nincsenek, ezért csak feltételezésekkel élhetünk. A hidrogenázok a sejt metabolizmusában fontos szerepet töltenek be, de expressziójuk és érésük energiát és sok más fehérje közreműködését igénylő bonyolult

folyamat. Aerob körülmények között inaktív állapotban a hidrogenázok hővel és oxigénnel szemben ellenállóak, de többségük aktív állapotában igen érzékeny az oxigénre. Több baktériumban a hidrogén szenzor hidrogenázok feladata annak szabályozása, hogy csak anaerob körülmények között expresszálódjon az adott sejt többi hidrogenáza. *Thiocapsa*-ban ennek a rendszernek az elemei megtalálhatóak (HupUV, HupT, HupR), de a rendszer maga nem működik. Az autokatalitikus mechanizmus révén a sejtnek elegendő csupán néhány aktív hidrogenáz formát előállítania, melyek azután az előzőleg már létrehozott inaktív enzimformákat aktiválják, ha megfelelőek a körülmények, s így a sejt nem pazarol időt és energiát a szintézisre.

6. Irodalomjegyzék

- Albracht, S.P. (1994) Nickel hydrogenases: in search of the active site. *Biochim Biophys Acta*, 1188, 167-204.
- Armstrong, F.A. (2004) Hydrogenases: active site puzzles and progress. *Curr Opin Chem Biol*, 8, 133-140.
- Bagley, K.A., Duin, E.C., Roseboom, W., Albracht, S.P., Woodruff, W.H. (1995) Infrareddetectable groups sense changes in charge density on the nickel center in hydrogenase from *Chromatium vinosum*. *Biochemistry*, 34, 5527-5535.
- Bagyinka, Cs., Kovács, K.L., Rák, E. (1982) Localization of hydrogenase in *Thiocapsa roseopersicina* photosynthetic membrane. *Biochem J*, 202, 255-258.
- Bagyinka, Cs., Zorin, N.A., Kovács, K.L. (1984) Unconsidered factors affecting hydrogenase activity measurement. *Anal Biochem*, 142, 7-15.
- Bagyinka, Cs., Whitehead J.P., Maroney, M.J. (1993) An X-ray absorption spectroscopic study of nickel redox chemistry in hydrogenase. *J Am Chem Soc*, 115, 3576-3585.
- Bagyinka, Cs., Ösz, J., Száraz, S. (2003) Autocatalytic oscillations in the early phase of the photoreduced methyl viologen-initiated fast kinetic reaction of hydrogenase. J Biol Chem, 278, 20624-20627.
- Bazsa, Gy. (1992) Nemlineáris dinamika és egzotikus kinetikai jelenségek kémiai rendszerekben.
- Bazsa, Gy., Epstein, I.R. (1985) Travelling waves in the nitric acid-iron(II) reaction. J Phys Chem, 89, 3050-3053.
- Berks, B.C. (1996) A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors? *Mol Microbiol*, 22, 393-404.
- Bleijlevens, B., Buhrke, T., van der Linden, E., Friedrich, B., Albracht, S.P. (2004) The auxiliary protein HypX provides oxygen tolerance to the soluble [NiFe]-hydrogenase of ralstonia eutropha H16 by way of a cyanide ligand to nickel. *J Biol Chem*, 279, 46686-46691.
- Blokesch, M., Bock, A. (2002) Maturation of [NiFe]-hydrogenases in *Escherichia coli*: the HypC cycle. *J Mol Biol*, 324, 287-296.
- Blokesch, M., Paschos, A., Theodoratou, E., Bauer, A., Hube, M., Huth, S., Bock, A. (2002) Metal insertion into NiFe-hydrogenases. *Biochem Soc Trans*, 30, 674-680.

- Brecht, M., van Gastel, M., Buhrke, T., Friedrich, B., Lubitz, W. (2003) Direct detection of a hydrogen ligand in the [NiFe] center of the regulatory H2-sensing hydrogenase from *Ralstonia eutropha* in its reduced state by HYSCORE and ENDOR spectroscopy. J Am Chem Soc, 125, 13075-13083.
- Blum, H., Beier, H., Gross, H.J. (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 8, 93-99.
- Cacace, M.G., Landau, E.M., Ramsden, J.J. (1997) The Hofmeister series: salt and solvent effects on interfacial phenomena. *Q Rev Biophys*, 30, 241-277.
- Cammack, R., Bagyinka, Cs., Kovács, K.L. (1989) Spectroscopic characterization of the nickel and iron-sulphur clusters of hydrogenase from the purple photosynthetic bacterium *Thiocapsa roseopersicina*. 1. Electron spin resonance spectroscopy. *Eur J Biochem*, 182, 357-362.
- Cammack, R., Fernandez, V.M., Hatchikian, E.C. (1994) Nickel-iron hydrogenase. *Meth Enzymol*, 243, 43-68.
- Cammack, R., Frey, M., Robson, R. (2001) Hydrogen as a Fuel. Taylor & Francis, London.
- Colbeau, A., Kovács, K.L., Chabert, J., Vignais, P.M. (1994) Cloning and sequence of the structural (hupSLC) and accessory (hupDHI) genes for hydrogenase biosynthesis in *Thiocapsa roseopersicina*. *Gene*, 140, 25-31.
- Dahl, C., Rákhely, G., Pott-Sperling, A.S., Fodor, B., Takács, M., Tóth, A., Kraeling, M., Győrfi, K., Kovács, A., Tusz, J. és mtsai (1999) Genes involved in hydrogen and sulfur metabolism in phototrophic sulfur bacteria. *FEMS Microbiol Lett*, 180, 317-324.
- Dekker, C., Agianian, B., Weik, M., Zaccai, G., Kroon, J., Gros, P., de Kruijff, B. (2001) Biophysical characterization of the influence of salt on tetrameric SecB. *Biophys J*, 81, 455-462.
- De Lacey, A.L., Moiroux, J., Bourdillon, C. (2000) Simple formal kinetics for the reversible uptake of molecular hydrogen by [NiFe] hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*. *Eur J Biochem*, 267, 6560-6570.
- Dér, A., Bagyinka, Cs., Páli, T., Kovács, K.L. (1985) Effect of enzyme concentration on apparent specific activity of hydrogenase. *Anal Biochem*, 150, 481-486.
- Dér, A., Kelemen, L., Fábián, L., Taneva, S.G., Fodor, E., Páli, T., Cupane, A., Cacace, M.G., Ramsden, J.J. (2007) Interfacial water structure controls protein conformation. *J Phys Chem B*, 111, 5344-5350.
- Dér, A., Ramsden, J.J. (1998) Evidence for loosening of a protein mechanism. *Naturwissenschaften*, 85.

- Dischert, W., Vignais, P.M., Colbeau, A. (1999) The synthesis of *Rhodobacter capsulatus* HupSL hydrogenase is regulated by the two-component HupT/HupR system. *Mol Microbiol*, 34, 995-1006.
- Elsen, S., Duche, O., Colbeau, A. (2003) Interaction between the H2 sensor HupUV and the histidine kinase HupT controls HupSL hydrogenase synthesis in *Rhodobacter capsulatus*. *J Bacteriol*, 185, 7111-7119.
- Epstein, I.R., Pojman, J.A. (1998) An introduction to nonlinear chemical dynamics. Oxford University Press, Oxford, New York
- Fancy, D.A., Kodadek, T. (1999) Chemistry for the analysis of protein-protein interaction: Rapid and efficient cross-linking triggered by long wavelength light. *Proc Natl Acad Sci*, 96, 6020-6024.
- Fernandez, V.M., Hatchikian, E.C., Cammack, R. (1985) Properties and reactivation of 2 different deactivated forms of *Desulfovibrio gigas* hydrogenase. *BBA*, 832 (1), 69-79.
- Foerster, S., Stein, M., Brecht, M., Ogata, H., Higuchi, Y., Lubitz, W. (2003) Single crystal EPR studies of the reduced active site of [NiFe] hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F. *J Am Chem Soc*, 125, 83-93.
- Forzi, L., Hellwig, P., Thauer, R.K., Sawers, R.G. (2007) The CO and CN(-) ligands to the active site Fe in [NiFe]-hydrogenase of *Escherichia coli* have different metabolic origins. *FEBS Lett*, 581, 3317-3321.
- Garcin, E., Vernede, X., Hatchikian, E.C., Volbeda, A., Frey, M., Fontecilla-Camps, J.C. (1999) The crystal structure of a reduced [NiFeSe] hydrogenase provides an image of the activated catalytic center. *Structure*, 7, 557-566.
- Georgieva, E.R., Narvaez, A.J., Hedin, N., Graslund, A. (2008) Secondary structure conversations of *Mycobacterium tuberculosis* ribonucleotide reductase protein R2 under varying pH and temperature conditions. *Biophys Chem*, 137, 43-48.
- Happe, R.P., Roseboom, W., Egert, G., Friedrich, C.G., Massanz, C., Friedrich, B., Albracht, S.P. (2000) Unusual FTIR and EPR properties of the H₂-activating site of the cytoplasmic NAD-reducing hydrogenase from *Ralstonia eutropha*. *FEBS Lett*, 466, 259-263.
- Hofmeister, F. (1888) Zur Lehre von der Wirkung der Salze. Zweite Mittheilung. Arch Exp Pathol Pharmakol, 24, 247-260.
- Korbas, M., Vogt, S., Meyer-Klaucke, W., Bill, E., Lyon, E.J., Thauer, R.K., Shima, S. (2006)The iron-sulfur cluster-free hydrogenase (Hmd) is a metalloenzyme with a novel iron binding motif. *J Biol Chem*, 281, 30804-30813.

- Kovács, K.L., Bagyinka, Cs., Tigyi, G. (1988) Proteolytic resistance and its utilisation in purification in hydrogenase from *Thiocapsa roseopersicina*. *BBA*, 935, 166-172.
- Kovács, K.L., Bagyinka, Cs. (1990) Structural properties, functional states and physiological roles of hydrogenase in photosynthetic bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 87, 407-412.
- Kovács, K.L., Fodor, B., Kovács, Á.T., Csanádi, Gy., Maróti, G., Balogh, J., Arvani, S., Rákhely, G. (2002) Hydrogenases, accessory genes and the regulation of [NiFe] hydrogenase biosynthesis in *Thiocapsa roseopersicina*. (2002) *Int J Hydrogen Energy*, 27, 1463-1469.
- Kovács, A.T., Rákhely, G., Browning, D.F., Fülöp, A., Maróti, G., Busby, S.J. and Kovács,
 K.L. (2005) An FNR-type regulator controls the anaerobic expression of Hyn
 hydrogenase in *Thiocapsa roseopersicina*. J Bacteriol, 187, 2618-2627.
- Krasna, A.I., Rittenberg, D. (1954) The mechanism of action of the enzyme hydrogenase. J Am Chem Soc, 76, 3015-3020.
- Kunz, W., Henle, J., Ninham, B.W. (2004) The present state of affairs with Hofmeister effects. *Curr Opin Colloid Interface Sci*, 9, 19-37.
- Kurkin, S., George, S.J., Thorneley, R.N., Albracht, S.P. (2004) Hydrogen-induced activation of the [NiFe]-hydrogenase from *Allochromatium vinosum* as studied by stopped-flow infrared spectroscopy. *Biochemistry*, 43, 6820-6831.
- Lamle, S.E., Albracht, S.P., Armstrong, F.A. (2004) Electrochemical potential-step investigations of the aerobic interconversions of [NiFe]-hydrogenase from *Allochromatium vinosum*: insights into the puzzling difference between unready and ready oxidized inactive states. J Am Chem Soc, 126, 14899-14909.
- Lenz, O., Bernhard, M., Buhrke, T., Schwartz, E., Friedrich, B. (2002) The hydrogen-sensing apparatus in *Ralstonia eutropha*. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 4, 255-262.
- Li, Z.L., Ohki, Y., Tatsumi, K. (2005) Dithiolato-bridged dinuclear iron-nickel complexes [Fe(CO)₂(CN)₂(mu-SCH₂CH₂CH₂S)Ni(S₂CNR₂)]- modeling the active site of [NiFe] hydrogenase. J Am Chem Soc, 127 (25), 8950-8951.
- Lissolo, T., Pulvin, S., Thomas, D. (1984) Reactivation of the hydrogenase from *Desulfovibrio gigas* by hydrogen. Influence of redox potential. *J Biol Chem*, 259, 11725-11729.
- Lyon, E.J., Shima, S., Boecher, R., Thauer, R.K., Grevels, F.W., Bill, E., Roseboom, W., Albracht, S.P. (2004) Carbon monoxide as an intrinsic ligand to iron in the active site of the iron-sulfur-cluster-free hydrogenase H₂-forming methylenetetrahydromethanopterin
dehydrogenase as revealed by infrared spectroscopy. J Am Chem Soc, 126, 14239-14248.

- Magalon, A., Bock, A. (2000) Dissection of the maturation reactions of the [NiFe] hydrogenase 3 from *Escherichia coli* taking place after nickel incorporation. *FEBS Lett*, 473, 254-258.
- Maier, T., Lottspeich, F., Bock, A. (1995) GTP hydrolysis by HypB is essential for nickel insertion into hydrogenases of *Escherichia coli*. *Eur J Biochem*, 230, 133-138.
- Maniatis, T., Sambrook, J., Fritsch, E.F. (1989) Molecular cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Maróti, G., Fodor, B.D., Rákhely, G., Kovács, Á.T., Arvani, S. and Kovács, K.L. (2003) Accessory proteins functioning selectively and pleiotropically in the biosynthesis of [NiFe] hydrogenases in *Thiocapsa roseopersicina*. *Eur J Biochem*, 270, 2218-2227.
- Mazet, M., Diogon, M., Alderete, J.F., Vivares, C.P., Delbac, F. (2008) First molecular characterisation of hydrogenosomes in the protosoan parasite *Histomonas meleagridis*. *Int J Parasitol*, 38 (2), 177-190.
- Mehra, A., Hong, C.I., Shi, M., Loros, J.J., Dunlap, J.C., Ruoff, P. (2006) Circadian rhythmicity by autocatalysis. *PLoS Comput Biol*, 2, e96.
- Montet, Y., Amara, P., Volbeda, A., Vernede, X., Hatchikian, E.C., Field, M.J., Frey, M., Fontecilla-Camps, J.C. (1997) Gas access to the active site of Ni-Fe hydrogenases probed by X-ray crystallography and molecular dynamics. *Nat Struct Biol*, 4, 523-526.
- Nakajima, M., Imai, K., Ito, H., Nishiwaki, T., Murayama, Y., Iwasaki, H., Oyama, T., Kondo, T. (2005) Reconstitution of circadian oscillation of cyanobacterial KaiC phosphorylation *in vitro*. *Science*, 308, 414-415.
- Ogata, H., Hirota, S., Nakahara, A., Komori, H., Shibata, N., Kato, T., Kano, K., Higuchi, Y. (2005) Activation process of [NiFe] hydrogenase elucidated by high-resolution X-ray analyses: conversion of the ready to the unready state. *Structure*, 13, 1635-1642.
- Ösz, J. (2005) A hidrogenáz enzim autokatalitikus működése. doktori disszertáció
- Ösz, J., Bagyinka, Cs. (2005) An autocatalytic step in the reaction cycle of hydrogenase from *Thiocapsa roseopersicina* can explain the special characteristics of the enzyme reaction. *Biophys J*, 89, 1984-1989.
- Ősz, J., Bodó, G., Branca, R.M., 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.

- Palágyi-Meszaros, L.S., Maróti, J., Latinovics, D., Balogh, T., Klement, E., Medzihradszky, K.F., Rákhely, G., Kovács, K.L. (2009) Electron-transfer subunits of the NiFe hydrogenases in *Thiocapsa roseopersicina* BBS. *Febs J*, 276, 164-174.
- Peters, J.W., Lanzilotta, W.N., Lemon, B.J., Seefeldt, L.C. (1998) X-ray crystal structure of the Fe-only hydrogenase (CpI) from *Clostridium pasteurianum* to 1.8 angstrom resolution. *Science*, 282, 1853-1858.
- Pierik, A.J., Roseboom, W., Happe, R.P., Bagley, K.A., Albracht, S.P. (1999) Carbon monoxide and cyanide as intrinsic ligands to iron in the active site of [NiFe]hydrogenases. NiFe(CN)₂CO, Biology's way to activate H₂. *J Biol Chem*, 274, 3331-3337.
- Prusiner, S.B. (1998) Prions. Proc Natl Acad Sci U S A, 95, 13363-13383.
- Przybyla, A.E., Robbins, J., Menon, N., Peck, H.D., Jr. (1992) Structure-function relationships among the nickel-containing hydrogenases. *FEMS Microbiol Rev*, 8, 109-135.
- Rákhely, G., Colbeau, A., Garin, J., Vignais, P.M., Kovács, K.L. (1998) Unusual organization of the genes coding for HydSL, the stable [NiFe]hydrogenase in the photosynthetic bacterium *Thiocapsa roseopersicina* BBS. *J Bacteriol*, 180, 1460-1465.
- Rákhely, G., Kovács, A.T., Maróti, G., Fodor, B.D., Csanádi, G., Latinovics, D., Kovács, K.L. (2004) Cyanobacterial-type, heteropentameric, NAD+-reducing NiFe hydrogenase in the purple sulfur photosynthetic bacterium *Thiocapsa roseopersicina*. *Appl Environ Microbiol*, 70, 722-728.
- Rákhely, G., Laurinavichene, T.V., Tsygankov, A.A., Kovács, K.L. (2007) The role of Hox hydrogenase in the H2 metabolism of *Thiocapsa roseopersicina*. *Biochim Biophys Acta*, 1767, 671-676.
- Rodrigue, A., Chanal, A., Beck, K., Muller, M., Wu, L.F. (1999) Co-translocation of a periplasmic enzyme complex by a hitchhiker mechanism through the bacterial tat pathway. *J Biol Chem*, 274, 13223-13228.
- Rossmann, R., Sawers, G., Böck, A. (1991) Mechanism of regulation of the formatehydrogenlyase pathway by oxygen, nitrate, and pH: definition of the formate regulon. *Mol Microbiol*, 5 (11), 2807-2814.
- Rousset, M., Montet, Y., Guigliarelli, B., Forget, N., Asso, M., Bertrand, P., Fontecilla-Camps, J.C., Hatchikian, E.C. (1998) [3Fe-4S] to [4Fe-4S] cluster conversion in *Desulfovibrio fructosovorans* [NiFe] hydrogenase by site-directed mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 11625-11630.

- Sargent, F., Bogsch, E.G., Stanley, N.R., Wexler, M., Robinson, C., Berks, B.C., Palmer, T. (1998) Overlapping functions of components of a bacterial Sec-independent protein export pathway. *Embo J*, 17, 3640-3650.
- Sargent, F., Stanley, N.R., Berks, B.C., Palmer, T. (1999) Sec-independent protein translocation in *Escherichia coli*. A distinct and pivotal role for the TatB protein. *J Biol Chem*, 274, 36073-36082.
- Shima, S., Pilak, O., Vogt, S., Schick, M., Stagni, M.S., Meyer-Klaucke, W., Warkentin, E., Thauer, R.K., Ermler, U. (2008) The crystal structure of [Fe]-hydrogenase reveals the geometry of the active site. *Science*, 321, 572-575.
- Showalter, K. (1981) Trigger waves in the acidic bromate oxidation of ferroin. *J Phys Chem*, 85, 440-447.
- Skhundina, I.S., Ter-Avanesyan, M.D. (2008) Prions. *Biochemistry (Moscow)*, 72 (13), 1519-1536.
- Song, L.C., Li, C.G., Ge, J.H., Yang, Z.Y., Wang, H.T., Zhang, J., Hu, Q.M. (2008) Synthesis and structural characterization of the mono- and diphosphine-containing diiron propanedithiolate complexes related to [FeFe]-hydrogenases. Biomimetic H₂ evolution catalyzed by (mu-PDT)Fe₂(CO)₄[(Ph₂P)₂N(n-Pr)]. *J Inorg Biochem*, 102 (11), 1973-1979.
- Stein, M., van Lenthe, E., Baerends, E.J., Lubitz, W. (2001) Relativistic DFT calculations of the paramagnetic intermediates of [NiFe] hydrogenase. Implications for the enzymatic mechanism. J Am Chem Soc, 123, 5839-5840.
- Szilágyi, A., Kovács, K.L., Rákhely, G., Závodszky, P. (2002) Homology modeling reveals the structural background of the striking difference in thermal stability between two related [NiFe]hydrogenases. J Mol Model, 8, 58-64.
- Thauer, R.K., Klein, A.R., Hartmann, G.C. (1996) Reactions with Molecular Hydrogen in Microorganisms: Evidence for a Purely Organic Hydrogenation Catalyst. *Chem Rev*, 96, 3031-3042.
- Theodoratou, E., Paschos, A., Magalon, A., Fritsche, E., Huber, R., Bock, A. (2000) Nickel serves as a substrate recognition motif for the endopeptidase involved in hydrogenase maturation. *Eur J Biochem*, 267, 1995-1999.
- Theodoratou, E., Paschos, A., Mintz, W., Bock, A. (2000) Analysis of the cleavage site specificity of the endopeptidase involved in the maturation of the large subunit of hydrogenase 3 from *Escherichia coli*. *Arch Microbiol*, 173, 110-116.

- Tigyi, G., Bagyinka, Cs., Kovács, K.L. (1986) Protein structural changes associated with active and inactive states of hydrogenase from *Thiocapsa roseopersicina*. *Biochimie*, 68, 69-74.
- van der Linden, E., Burgdorf, T., Bernhard, M., Bleijlevens, B., Friedrich, B., Albracht, S.P. (2004) The soluble [NiFe]-hydrogenase from *Ralstonia eutropha* contains four cyanides in its active site, one of which is responsible for the insensitivity towards oxygen. *J Biol Inorg Chem*, 9, 616-626.
- van der Zwaan, J.W., Coremans, J.M., Bouwens, E.C., Albracht, S.P., Slater, E.C. (1990) Effect of ¹⁷O₂ and ¹³CO on EPR spectra of nickel in hydrogenase from *Chromatium vinosum*. *Biochim Biophys Acta*, 1041 (2), 101-110.
- Vignais, P.M., Billoud, B., Meyer, J. (2001) Classification and phylogeny of hydrogenases. *FEMS Microbiol Rev*, 25 (4), 445-501.
- Vignais, P.M., Cournac, L., Hatchikian, E.C., Elsen, S., Serebryakova, L., Zorin, N.A., Dimon, B. (2002) Continuos monitoring of the activation and activity of [NiFe]hydrogenases by membrane-inlet mass spectrometry. *Int J Hydrogen Energy*, 27, 1441-1448.
- Vignais, P.M., Billoud, B. (2007) Occurrence, classification, and biological function of hydrogenases: an overview. *Chem Rev*, 107, 4206-4272.
- Volbeda, A., Charon, M.H., Piras, C., Hatchikian, E.C., Frey, M., Fontecilla-Camps, J.C. (1995) Crystal structure of the nickel-iron hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*. *Nature*, 373, 580-587.
- Volbeda, A., Martin, L., Cavazza, C., Matho, M., Faber, B.W., Roseboom, W., Albracht, S.P., Garcin, E., Rousset, M., Fontecilla-Camps, J.C. (2005) Structural differences between the ready and unready oxidized states of [NiFe] hydrogenases. *J Biol Inorg Chem*, 10, 239-249.
- Voorduw, G. (1992) Evolution of hydrogenase genes. Adv Inorg Chem, 38, 397-422.
- Weiner, J.H., Bilous, P.T., Shaw, G.M., Lubitz, S.P., Frost, L., Thomas, G.H., Cole, J.A., Turner, R.J. (1998) A novel and ubiquitous system for membrane targeting and secretion of cofactor-containing proteins. *Cell*, 93, 93-101.
- Witz, D.M., Epstein, I.R. (1984) Spatial waves in the reaction of chlorite with iodide. *J Phys Chem*, 88, 5300-5304.
- Wu, L.F., Mandrand, M.A. (1993) Microbial hydrogenases: primary structure, classification, signatures and phylogeny. *FEMS Microbiol Rev*, 10, 243-269.

- Yuvanlyama, P., Agar, J.N., Cash, V.L., Johnson, M.K., Dean, D.R. (2000) NifS-directed assembly of a transient [2Fe-2S] cluster within the NiU protein. *Proc Natl Acad Sci* USA, 97, 599-604.
- Zirngibl, C., Van Dongen, W., Schwörer, B., Von Bünau, R., Richter, M., Klein, A., Thauer, R.K. (1992) H₂-forming methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase, a novel type of hydrogenase without iron-sulfur clusters in methanogenic archaea. *Eur J Biochem*, 208 (2), 511-520.
- Zorin, N.A., Dimon, B., Gagnon, J., Gaillard, J., Carrier, P., Vignais, P.M. (1996) Inhibition by iodoacetamide and acetylene of the H-D-exchange reaction catalyzed by *Thiocapsa roseopersicina* hydrogenase. *Eur J Biochem*, 241, 675-681.

7. Összefoglalás

A hidrogenázok olyan fémtartalmú enzimek, melyek a molekuláris hidrogén reverzibilis oxidációját illetve redukcióját képesek katalizálni: $H_2 \rightleftharpoons 2 H^+ + 2e^-$. A hidrogén felvevő irány az energia konzerváló reakciókhoz kapcsolódik (pl.: NAD(P)H képzés, metántermelés), a hidrogén fejlesztő irány pedig a felesleges redukáló potenciálok megszüntetéséhez. Elsősorban archeákban és prokariótákban fordulnak elő. A [NiFe] hidrogenázok általában kis (~30 kDa) és nagy (~60 kDa) alegységből felépülő heterodimer fehérjék. A hidrogén hasítása és képzése a NiFe centrumban történik a nagy alegységen, az elektronok szállításában a kis alegységen található vas-kén kockák vesznek részt.

A hidrogenázok aerob körülmények között inaktívak, működésükhöz aktiválás szükséges, ami általában hidrogén alatti inkubálást jelent. Az enzim aktiválása és működése közben a fémcentrum redox változásokon megy át, melyek különféle spektroszkópiai technikákkal (EPR, FTIR) követhetőek. Ezek alapján többféle enzimforma is elkülöníthető. A katalitikus ciklust illetően több modell született már, melyek főként ezekre az enzimformákra épülnek.

А Thiocapsa roseopersicina baktérium, egy Gram negatív gammaа proteobaktériumokon belül а fotoszintetizáló bíbor kénbaktériumok csoportjába (Chromatiales, Chromatiaceae család) tartozik. A membrán asszociált HynSL hidrogenáza régóta ismert, két alegységes fehérje (34 kDa és 64 kDa), egyelőre csak ezt az egy hidrogenázt tisztították ki a baktériumból. Az enzim jellemzője, hogy hőstabil, habár maga a baktérium nem termofil, proteolitikus emésztésnek jól ellenáll, és aerob körülmények között is megőrzi aktivitását.

Az aktivitás mérési kísérletek során derült fény az enzim sajátos működésére. Az enzim specifikus aktivitása függ az enzimkoncentrációtól, és a hidrogén felvevő reakció lag fázissal indul, aminek a hossza fordítottan arányos az enzimkoncentrációval. Küvettában és vékonyréteg kísérletekben térbeli mintázat alakul ki a reakció során, utóbbiakban állandó sebességgel haladó reakciófrontok figyelhetőek meg. E tulajdonságok alapján egy autokatalitikus lépést feltételeztünk az enzim működése során és az autokatalitikus reakciómodell alapján végzett számolások alátámasztották a kísérleti megfigyeléseket. Alapul véve a korábbi enzim modelleket ezért egy módosított autokatalitikus trianguláris modellt állítottunk fel. Az autokatalizátor természetére és az autokatalitikus lépés helyére vonatkozóan a korábbi kísérletek alapján egy prion típusú autokatalitikus lépés képzelhető el az

enzimcikluson belül. Előbbire azok a vékonyréteg kísérletek utalnak, melyekben különböző anyagokat oltva a reakcióelegybe új startpontok kialakulását kaptuk. Az aktivált enzimmel végzett kísérletek sikeresek voltak, míg az aerob enzim és a redukált elektron akceptor (termék) hatástalannak bizonyultak. Az aktivált enzimmel végzett aktivitás mérések is lag fázissal indultak, ezért az autokatalitikus lépés valószínűleg az enzimcikluson belül helyezkedik el.

A dolgozatban leírt munkában további vizsgálatokat végeztünk, hogy meghatározzuk az autokatalitikus reakcióra ható egyes faktorokat, és hogy további bizonyítékokat szerezzünk az autokatalízis módját és enzimciklusban elfoglalt helyét illetően.

Vékonyrétegben vizsgáltuk hogyan alakul az autokatalitikus front haladási sebessége és a térbeli mintázat különböző enzim-, oxidált elektron akceptor-, hidrogén- és proton koncentráció mellett.

Az enzim koncentráció változtatása egyértelműen befolyásolta a frontsebességet, a sebesség az enzimkoncentrációtól négyzetgyökösen függ, ami a hidrogenáz, mint autokatalizátor szerepét bizonyítja. Ugyanakkor az oxidált elektron akceptor koncentrációjának növelésére a front haladási sebessége csökkent, amiből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy az autokatalizátorral közvetlen kölcsönhatásban van az oxidált elektron akceptor. Egy hidrogenáz formát feltételezve autokatalizátorként ez a kölcsönhatás a fehérje kis alegységén található disztális vas-kén kockán keresztül képzelhető el. Ezeket az eredményeket alapul véve a korábbi autokatalitikus trianguláris modellünket módosítottuk. Kétféle modellt is felállítottunk, az egyikben az enzimcikluson belül a másikban az enzimcikluson kívül helyeztük el az autokatalitikus lépést. A modellek in silico analízisével szándékoztunk eldönteni az autokatalitikus lépés helyét, azonban a számolások eredményeként azt kaptuk, hogy mindkét modell esetében a kísérleti adatokkal összhangban lévő frontsebesség változás alakul ki, bár az oxidált elektron akceptor koncentráció növelése a modellek szerint szűkebb koncentrációtartományban okozza a frontsebesség nagymértékű csökkenését.

A szubsztrát (hidrogén) koncentrációjának változtatása nem okozott szignifikáns változást, míg a proton koncentráció (pH) változtatása érdekes és egyelőre nehezen értelmezhető eredményt hozott, aminek oka az lehet, hogy a hidrogénionok hatása kettős, egyrészt termékként szerepelnek a reakcióban, másrészt a fehérje szerkezetére, s így az enzim működésére is hatással vannak.

Egy fontos eredmény, hogy sikerült olyan reakció körülményeket találni, mely körülmények között a hidrogenáz oszcilláló reakciót mutat. Az autokatalitikus reakciók

gyakran vesznek részt oszcilláló reakciókban, ezért ezt az autokatalitikus folyamat létezését igazoló lényeges bizonyítéknak tekinthetjük.

A hidrogenáz esetében a prion típusú autokatalízist tartjuk valószínűnek, mely során fehérje-fehérje kölcsönhatás és indukált konformáció változás történik. A hidrogenáz különböző állapotaiban (levegőn illetve hidrogén alatt) végzett keresztkötési vizsgálatok szerint valóban fizikai kölcsönhatás jön létre a fehérje molekulák között, s ez a kölcsönhatás a kis alegységeken keresztül történik. A konformáció változás feltételezésével összhangban vannak a Hofmeister sorozatból származó különböző anionok jelenlétében elvégzett vékonyréteg kísérletek eredményei is, ugyanis a konformáció változást elősegítő kaotróp só hatására lényegesen csökkent a frontsebesség, és a kozmotróp só sem volt aktiváló hatással az autokatalitikus reakcióra, s így a front haladási sebességére. A konformáció változás kimutatását célzó DLS mérések eredményeként azt a következtetést vonhatjuk le, hogy ha történik konformáció változás az autokatalitikus reakció során, akkor az csak egy minimális mértékű változás lehet.

Összegezvén az elért eredményeket megállapíthatjuk, hogy további bizonyítékokat találtunk, melyek a Hyn hidrogenáz működésének autokatalitikus természetére utalnak. Az autokatalitikus lépés két enzimforma kölcsönhatása és a nem autokatalizátor enzimforma kismértékű konformáció változása lehet. Az autokatalizátorral az oxidált elektron akceptor közvetlen kölcsönhatásba lép. A korábbi modell módosításával új modelleket állítottunk fel, melyekkel az újabb eredményeket sikerült alátámasztani.

8. Summary

Hydrogenases are metalloenzymes which catalyze the reversible oxidation and reduction of molecular hydrogen: $H_2 = 2 H^+ + 2e^-$. Hydrogen uptake is coupled to energy conversation (producing NAD(P)H, methane), while hydrogen evolution is a way of releasing excess reductants. Hydrogenases can be found mainly in Archea and prokaryotes. [NiFe] hydrogenases are heterodimers consisting of a small (~30 kDa) and a large subunit (~60 kDa). Cleavage of molecular hydrogen happens at the NiFe center in the large subunit, while iron-sulfur clusters locating on the small subunit shuttle the electrons.

Under aerobic conditions hydrogenases are inactive; they need activation which is usually done by incubating the enzyme under hydrogen. Redox changes at the active sites during activation and function can be monitored by different spectroscopic methods (EPR, FTIR) and different enzyme forms can be distinguished. Based on these enzyme forms several enzyme models were constructed.

Thiocapsa roseopersicina is a Gram negative photosynthetic purple sulfur bacteria, it belongs to gamma Proteobacteria (Chromatiales, Chromatiaceae). It contains several [NiFe] hydrogenases. One of them is the HynSL hydrogenase which is a membrane associated heterodimer protein consisting of a small and a large subunit of 34 kDa and 64 kDa respectively. Only Hyn hydrogenase could be purified from *Thiocapsa* in a sufficient amount for biophysical investigations. The enzyme shows stability against oxygen, proteolytic cleavage and heat, although the bacteria itself is not thermophilic.

During activity measurements Hyn hydrogenase shows special kinetics. Its specific activity depends on protein concentration, the hydrogen uptake reaction starts with a lag phase, whose length decreases by increasing enzyme concentration. The reaction shows special spatial pattern both in bulk and in thin layer, fronts propagating by constant velocity. Based on these characteristics and considering previous enzyme models we constructed an autocatalytic enzyme model which explains the experimental results. Regarding the nature of the autocatalyst and location of the autocatalytic reaction we suggest a prion type autocatalysis inside the enzyme cycle.

In the present work we have performed further investigations to determine the factors affecting the autocatalytic process in hydrogenase enzyme reaction and gain further evidences for the type and location of the autocatalytic step.

We have investigated the effect of different enzyme-, electron acceptor-, hydrogen- and proton concentrations on the front velocity and the reaction pattern observed in thin layer reaction chamber.

As anticipated, the front velocity increased as a square root function by increasing enzyme concentration, which proves the role of hydrogenase as autocatalyst. Increasing electron acceptor concentration caused a decreasing front velocity which implies that the substrate reacts directly with the autocatalyst form of the enzyme. This interaction takes place through the distal FeS cluster in the hydrogenase. Focusing on these new experimental observations we constructed a modified autocatalytic triangular enzyme model. Two generic models were presented: first one considered the autocatalytic step within the enzymatic cycle, while in the second one it was outside the enzyme cycle. According to *in silico* analysis both models supported experimental observations, although the transition from full velocity to zero by increasing electron acceptor concentration in both cases was sharper than that was measured experimentally.

Different hydrogen (substrate) concentration did not caused significant change in front velocity, while different proton concentrations (pH) resulted in an interesting and hardly explicable changes, which can be explained by dual roles of protons, first as products of the autocatalytic reaction and second as factors affecting protein structure.

Generating oscillations in the hydrogenase reaction was a very important achievement, which again proved the existence of an autocatalytic process.

In the case of hydrogenase we hypothesized a prion type autocatalysis, which implies protein-protein interaction and an induced conformational change. Protein cross-linking experiments in different states of hydrogenase (under air and hydrogen) demonstrated an interaction of two small subunits of hydrogenase molecules. Results of experiments in thin layer reaction chamber in the presence of different kind of anion from the Hofmeister series also favored this assumption. All type of salts (kosmotropic, chaotropic and neutral) influenced the autocatalytic pattern, but only the chaotropic salt, which favors protein conformation change, decreased significantly the front velocity. In DLS experiments we could not detect significant changes in the hydrogenase conformation during activation, so the conformation change should not significantly alter the hydrodynamic radius of the molecule.

Summarizing our recent results we concluded that there are further evidences for autocatalytic mechanism of Hyn hydrogenase. The autocatalytic step is an interaction of two enzyme forms and during this interaction a small conformational change should happen. Electron acceptor interacts directly with the autocatalyst enzyme form.

Köszönetnyilvánítás

Elsősorban témavezetőmnek, Dr. Bagyinka Csabának tartozok köszönettel az évek során nyújtott szakmai segítségért, támogatásért és bátorításért.

Köszönöm csoporttársaim, Dr. Ősz Judit és Dr. Rui Miguel Mamede Branca szakmai támogatását.

Köszönöm a Dr. Ormos Pál vezette MTA Szegedi Biofizikai Intézetének a munkámhoz szükséges feltételek biztosítását és az intézeti munkatársak támogatását.

Köszönöm Verebélyné Rózsának a munkámban nyújtott segítségét és szeretetteljes támogatását az élet más területein is.

Köszönetet mondok Dr. Tóth Ágotának, Dr. Horváth Dezsőnek szakmai segítségükért, amellyel a munkámat segítették.

Köszönöm Prof. Dr. Dékány Imrének a Kolloidkémiai Tanszék vezetőjének, hogy a DLS méréseket elvégezhettem a tanszéken és köszönöm Dr. Majzik Andrea segítségét a mérések során.

Köszönettel tartozok Prof. Dr. Kovács Kornél vezette hidrogenáz csoport valamennyi munkatársának, akik munkám sikeréhez bármilyen módon hozzájárultak.

Végezetül, de nem utolsósorban köszönetet mondok a családom összes tagjának, és édesanyámnak, aki tanulmányaimat lehetővé tette és végig bízott bennem.