

Bevezetés

A dolgozatban egy citokrom c_4 felfedezéséről és tulajdonságairól számolunk be, melyet a *Thiocapsa roseopersicina* bíbor kénbaktériumból tisztítottunk. A citokrom c_4 fehérjét kombinált redox és abszorpció, illetve CD spektroszkópiai módszerrel karakterizáltuk, s felhasználtunk DSC méréseket is. A mérési adatok alapján a fehérjét a c_4 citokromok családjába sorolhatjuk. Kifejlesztettünk egy új tömegspektroszkópiai módszert, mellyel meghatároztuk a fehérje szekvenciáját. A szekvencia alátámasztotta, hogy valóban egy citokrom c_4 fehérjét izoláltunk. Ez az első tisztított és azonosított citokrom c_4 fehérje, melyet anaerob fototróf baktériumból izoláltak.

Célkitűzések

Elsődleges célunk az volt, hogy redox fehérjéket tisztítsunk a *Thiocapsa roseopersicina* fotoszintetizáló bíbor kénbaktériumból., hogy megértsük az elektron transzport lánc szerkezetét és működését.

Ezen belül figyelmünket egy citokrom fehérjére fordítottuk, s meghatároztuk

- az elsődleges szerkezetét a legújabb tömegspektrometriai módszerekkel,
- a fehérje hem tartalmát, s az egyes redox centrumok redox potenciálját,
- oxigén érzékenységét, ami annak fényében különösen érdekes, hogy az organizmus csak anaerob körülmények között fotoszintetizál,
- érzékenységét a magas hőmérsékletre, mivel az organizmus magas hőmérsékleten életképtelen,
- az oxigén és a hőmérséklet hatását a fehérje szerkezetére,
- valamint megvizsgáltuk a fehérje filogenetikai kapcsolatait is.

Végül az összes fent említett információ birtokában következtetéseket vontunk le a citokrom funkciójáról, s elhelyeztük azt a fototróf baktériumok elektron transzport láncában is.

Anyagok és Módszerek

A fehérjéket a *Thiocapsa roseopersicina* sejtekből acetonos kezeléssel vontuk ki. A keletkezett fehérje port 12 órán keresztül desztillált vízben kevertettük, hogy az oldható

fehérjéket megkapjuk. A tisztítás első lépése egy anioncserélő batch kromatográfia, melyet hidrofób kromatográfia és két újabb anioncserélő kromatográfia követett. A kromatografálásokat egy FPLC készülék segítségével végeztük. A fehérje frakciók tisztaságát és az egyes fehérjék molekulásúlyát SDS-PAGE segítségével határoztuk meg.

A citokróm hem tartalmát a piridin-hemokromogén módszerrel, a fehérje koncentrációkat pedig a Bradford módszerrel határoztuk meg.

A tömegspektrometriai mérésekhez használt emésztési stratégia során a fehérjét három különböző proteolitikus enzim kombinációjával hasítottuk, mely négy különböző emésztett fragmentumot eredményezett. Minden mérést az IT-FTICR hibrid készüléken végeztünk. A legtöbb mérés esetén az emésztéseket a készülékhez kapcsolt reverzfázisú micro-folyadék kromatográffal választottuk el. A frakciók ezután kerültek a tömegspektrográfba. A teljes tömegspektrumokat az FTICR-ban mértük meg, a kiválasztott ionokat (MS/MS) pedig az IT-ban analizáltuk. A peptid szekvenciák többségét az MS/MS spektrumokból állapítottuk meg a műszerhez tartozó szoftver segítségével.

A citokróm redox potenciálját egy házi készítésű spektro-elektrokémiai cellában mértük meg. A kívánt redox potenciál értéket egy potenciosztát segítségével állítottuk be.

A CD spektrumokat a távoli UV (190-250 nm) és a közeli UV – látható (250-700 nm) tartományban vettük fel. A hőmérsékletfüggő méréseket anaerob és aerob körülmények között végeztünk.

Hőmérsékletfüggő abszorpciós (UV-látható) és DSC mérések szolgáltatnak további információkat.

Eredmények és megbeszélésük

A citokróm c_4 két hemet tartalmaz molekulánként, amit először a piridin hemokromogén módszerrel állapítottunk meg, s amit a tömegspektroszkóppal kapott szekvencia adatok alátámasztottak.

A proteolitikus emésztésből származó peptidekeveréket tömegspektrográffal analizáltuk. A leggyakrabban előforduló ionokat táblázatba foglaltuk. Minden egyes peptidet ezek után MS/MS analízissel szekvenáltunk. A maximum 14 aminosavat tartalmazó peptideket (kb. 1500 Da tömegig) viszonylag egyszerű volt szekvenálni. Az ennél hosszabb peptidek szekvenálása jóval nehezebb feladatnak bizonyult. Az összes peptidszekvencia összekapcsolása eredményezte a *Thiocapsa roseopersicina* citokróm c_4 szekvenciáját. Legjobb tudomásunk szerint pillanatnyilag ez a leghosszabb fehérje amit kizárólag tömegspektroszkópiai módszerekkel szekvenáltak.

TDGHQAAAPQ VGDPQAGEAK ANGVCLACHG PQGNSLVPLW PKLAGQHPEY
IVKQLMDFKQ RRANEQMTPM AMPLTDQEV L DLAAYYATQP KTPGAADPEL
ASKGESLYRW GNPETGVPAC SGCHGPAGGA GQSLAKFPRL SAQHADYTKQ
TLEHFRGALR ANDPNGMMRG AAARLSDQEL AAVSQYLQGL SQ

Az általunk kidolgozott tömegspektroszkópiai módszer gyakran gyorsabb és egyszerűbb mint a fehérje szekvencia meghatározása géntechnológiai módszerrel.

A citokróm c_4 hőtűrő fehérjének bizonyult, amennyiben anaerob körülmények között tartjuk. Bebizonyítottuk, hogy magas hőmérsékleten az oxigén irreverzibilis konformációs változást okoz, valószínűleg bekötődik a hem hatodik ligand pozíciójába, mely magas hőmérsékleten felszabadul a metionin kötésből. Kimutattuk, hogy a metionin-Fe kötésnek meghatározó szerepe van a fehérje szerkezet fenntartásában valamint kulcsszerepet játszik a fehérje denaturálódásában.

A citokróm c_4 -nek eddig a légzési elektron transzport láncban volt feltételezett szerepe, közel az elektron transzport lánc terminális oxidáló végéhez. Egy ilyen citokróm felfedezése egy anaerob fotoszintetizáló organizmusban kétségessé teszi ezt a feltevést. A *Thiocapsa roseopersicina*ban a citokróm c_4 a fotoszintetikus elektron transzport láncban kell helyet foglaljon. Mivel a redox potenciálja 237 ± 5 mV, illetve 268 ± 6 mV a két hem esetében, úgy gondoljuk, hogy a citokróm c_4 a citokróm b/c_1 és a reakciócentrum tetrahem citokrómja között foglal helyet.

Filogenetikai vizsgálódásaink azt mutatták, hogy a citokróm c_4 igen elterjedt a γ -proteobaktériumok között. Ez valószínűsíti, hogy periplazmikus elektron hordozó szerepe általános lehet.

A bíbor nem-kén baktériumok esetében ezt a szerepet a citokróm c_2 játssza. Kézenfekvő feltételezni, hogy a bíbor kénbaktériumok esetében a dihem citokróm c_4 köti össze a kén metabolizmust a fotofoszforilációs ciklussal.

Tézispontok

- Kitisztítottunk egy új citokrómot a *Thiocapsa roseopersicina*-ból. Ez az első fotoszintetikus baktériumból tisztított és azonosított citokróm c_4 .
- Meghatároztuk a citokróm c_4 szekvenciáját. A *Thiocapsa roseopersicina* citokróm c_4 a legnagyobb fehérje melynek szekvenciáját kizárólag tömegspektroszkópai módszerekkel meghatározták.
- Kidolgoztunk egy új, tömegspektroszkópot felhasználó szekvenálási módszert, mely versenyképes az indirekt, DNS alapú szekvenálási módszerrel.
- Meghatároztuk a citokróm c_4 CD és abszorpciós spektroszkópai tulajdonságait, s korreláltuk azokat a fehérje struktúrális tulajdonságaival.
- Meghatároztuk a *T. roseopersicina* citokróm c_4 redox potenciál értékét.
- Felfedeztük, hogy a citokróm c_4 hőtűrő fehérje, s redukált állapotban, oxigénmentes környezetben igen stabil szerkezettel rendelkezik. Oxigén jelenlétében, oxidált állapotban melegítés hatására irreverzibilis konformációs változások zajlanak le, melynek során az oxigén a hem csoport felszabaduló hatodik ligand pozíciójába köt be, s ezzel inicializálja a konformációs változásokat.
- Filogenetikai vizsgálódásaink során megállapítottuk, hogy ez a fajta citokróm igen elterjedt a γ -proteobaktériumok körében, különösen az Oceanospirillales és a Chromatiales rendekben.
- A citokróm c_4 -et eddig a légzési elektrontranszport láncban helyezték el. Ezzel szemben mi kimutattuk, hogy a bíbor kénbaktériumokban a citokróm c_4 az anaerob fotoszintetikus elektrontranszport láncban foglal helyet.

Filename: Thesis summary (hungarian).doc
Directory: D:\Os meus documentos\PhD Thesis
Template: C:\Documents and Settings\Rui\Application
Data\Microsoft\Templates\Normal.dot
Title: Introduction
Subject:
Author: Rui Branca
Keywords:
Comments:
Creation Date: 21-06-2008 13:44:00
Change Number: 12
Last Saved On: 24-06-2008 16:06:00
Last Saved By: Rui Branca
Total Editing Time: 61 Minutes
Last Printed On: 24-06-2008 16:06:00
As of Last Complete Printing
Number of Pages: 4
Number of Words: 1,174 (approx.)
Number of Characters: 6,343 (approx.)