

# A 49276 számú, " A hidrogenáz autokatalitikus enzimreakciójának tanulmányozása" című OTKA pályázat zárójelentése

## Technikai jellegű eredményeink:

### ***Felépítettünk egy folyamatrögzítő és képanalizáló rendszert.***

Ennek részeként vásároltunk egy DCR PC típusú Sony gyártmányú kamerát. A kamera kiválasztását az indokolta, hogy a felvett képkockák időfelbontását a kamera saját szoftverével állítani lehet, ezért a mérések felvételéhez nincs szükség külön számítógépre, valamint a kamera rendelkezik *i-link* felülettel, ezért a felvételek számítógépre másolása könnyű. Ez a kamera rögzítette az autokatalitikus és oszcilláló reakciókat.

A reakcióedény alakját és formáját is sokszor változtattuk, míg megtaláltuk a legmegfelelőbb reakcióedény alakot. Próbálkoztunk hagyományos Petri csészével (amelyben az első kísérleteinket végeztük), mikroszkóphoz használatos cseppalakú bemélyedést tartalmazó tárgylemezzel, de minden elrendezésnek volt valami hátránya (nem volt homogén a reakció, térbeli alakzatok fejlődtek ki, stb.) Végül saját magunk állítottuk elő a mintatartót. Egy üveglapba 0.8-1 mm mély köralakú mélyedést csiszoltunk amit a reakcióeleggyel töltöttünk fel. Ezzel sikerült elérnünk, hogy a reakcióterefogat homogén egyenletes vastagságú és kellően vékony legyen. Ebben a mintatartóban már szabályos kör alakú frontokat tudtunk megfigyelni.

A rendszer kiépítéséhez egy megvilágító felületet is kellett készíteni, mely a mintatartót alulról világítja meg, ennek megtervezése és kivitelezése igen sokáig tartott. Kezdetben fehér lapokat világítottunk meg, majd fluoreszkáló lámpát helyeztünk a reakcióedény alá. A legújabb rendszerünkben egy ledes mátrix világítja meg a reakcióedényt. A sok próbálkozás ellenére a megvilágítás még mindig nem tökéletes.

Elkészítettük a kinetika kiértékelő szoftvert. Ez egy MATLAB program, melynek segítségével a frontok haladási sebességét lehet meghatározni.

Későbbi mérésekben kiépítettünk egy OD meghatározására alkalmas elrendezést. A rendszer egy Ocean Optics spektrométert használ, a fényt egy prizma és száloptika segítségével vezetjük a spektrométerbe. Ennek segítségével a reakcióedény egy jelentős részében mérhetjük meg a minta optikai denzitását. Elkészítettük ennek a mérésnek a kiértékelő szoftverét is MATLAB programban.

### ***Felépítettünk egy három elektródos redox cellát***

A redox cella teljesen házi készítésű, amivel fehérjék redox átmeneteit lehet követni a látható tartományban. Meghajtását egy vásárolt potenciosztát végzi.

Az SZTE Szerves Kémiai Tanszékével kooperációban szintetizálunk olyan redox festékeket amelyek különösen alkalmasak fehérje redox átmenetek detektálására, mert lefedik a fehérjékben előforduló redox tartományt és minimális abszorpcióval rendelkeznek a látható hullámhossz tartományban.

## **Új szekvenálási eljárást dolgoztunk ki melyet a citokróm c<sub>4</sub> fehérje szekvenciájának meghatározásával demonstráltunk**

A kristályosításhoz kísérleti nyúlként használt citokróm c<sub>4</sub> fehérje három dimenziós szerkezetének meghatározásához meg kellett határozni a citokróm fehérje szekvenciáját. Ehhez egy új tömegspektroszkópiai módszert dolgoztunk ki amerikai kooperációban.

## **Tudományos eredményeink:**

### **Kimutattuk, hogy a hidrogenáz enzimreakcióban legalább egy autokatalitikus lépés található, az autokatalizátor egy enzim forma, s az autokatalizátor kölcsönhat az oxidált elektron akceptorral.**

Kísérleteinkben kimutattuk, hogy a reakció során tipikus autokatalitikus hullámfrontok alakulnak ki, a hullámfrontokat beoltással inicializálni lehet. A beoltás során az enzimtartalmú oltóanyag hatásos, a redukált elektronakceptor tartalmú oltóanyag viszont csak igen nagy koncentrációban hatásos. A frontsebesség időben állandó. Mindezek közvetlen bizonyítékok az autokatalitikus reakció jelenlétére, s arra utalnak, hogy az autokatalizátor egy enzim forma.

Kimutattuk, hogy a hidrogenázok frontsebessége az enzimkoncentráció négyzetgyökös függvénye. Ez újabb bizonyíték amellyel, hogy az autokatalizátor egy enzim forma.

Kimutattuk, hogy a frontsebesség az elektron akceptor koncentrációjának növelésével (egy bizonyos koncentrációtartományban) csökken. Ez arra utal, hogy az autokatalizátor egy olyan enzimforma, amely közvetlen kölcsönhatásba lép az elektron akceptorral, vagyis egy olyan hidrogenáz melynek a disztális vas-kén kockája redukált állapotban van.

Elméleti modellt fejlesztettük, mely mindezeket a kísérleti jelenségeket megmagyarázza.

### **Kimutattuk, hogy a Hofmeister sók hatással vannak a hidrogenáz enzimreakcióra.**

Kimutattuk, hogy a hidrogenáz reakció kinetikája függ az oldatban jelenlévő sók koncentrációjától és minőségétől (a Hofmeister effektus befolyásolja a reakciókinetikát is). Kozmotropikus sók a reakciót nem befolyásolják, a reakció ugyanolyan jellegű mint sómentes reakcióelegyben, tehát autokatalitikus frontok alakulnak ki. Nagy koncentrációjú kaotropikus sók esetében azonban a reakció nem mutat frontokat, az egész oldat egyenletesen kékül. Hígítás hatására a reakció fokozatosan visszaáll, újra frontok keletkeznek.

Vizsgáltuk a sók hatását a hidrogenáz reakció kinetikájára is. Kinetikai méréseket végeztünk hidrogén felvevő és hidrogén termelő irányban.

### **CD méréseket végeztünk hidrogenázokon és citokróm c<sub>4</sub>-en, hogy a hőmérséklet és sók hatására bekövetkező szerkezetváltozásokat vizsgáljuk.**

A Hofmeister jelenség megértéséhez sók jelenlétében, CD spektroszkópiával vizsgáltuk a hidrogenáz másodlagos szerkezetét, s annak változását a hőmérséklet hatására. Citokrómmal előkísérleteket végeztünk, hogy a másodlagos szerkezetek hőmérséklet hatására bekövetkező változásait megismerjük. Méréseinket részben kudarc kísérte, mert a reakciókinetikában legalkalmasabbnak bizonyult só (Natrium tiocianát) használata a nagy távoli UV abszorpció miatt nem lehetséges. A további kaotropikus sók viszont mellékeffektusok miatt a reakciókinetikában nem adtak jól értékelhető képet (benzil viologén kicsapódott, stb).

Ezért azt tervezzük, hogy a kísérletsorozatot infravörös spektroszkópiai módszerrel megismételjük. Ennek a módszernek az információtartalma kisebb mint a CD kísérleteké lett volna viszont a jó effektust mutató sók is vizsgálhatók.

Citokróm  $c_4$ -gyel folytatott előkísérleteink viszont önálló eredménnyé fejlődtek. Megállapítottuk, hogy a citokrómnak oxidált és redox állapotában a hőtűrése és oxigénnel való kölcsönhatása különböző. Oxigén hiányában a citokróm hőtűrése mindkét állapotban sokkal nagyobb (90 fokon sem változott a redukált citokróm szerkezete), míg oxigén jelenlétében a fehérje szerkezete lényegesen megváltozik, a hem – fehérje kötés felbomlik és az oxigén a szabad helyre bekötődik. A fehérje inaktiválódik és hő hatására denaturálódik.

### ***Kristályosítási eredményeink***

Az autokatalitikus reakció szerkezeti következményeinek felderítésére elkezdtük cseh kooperációban a hidrogenáz kristályosítását. Pillanatnyilag még nincs sikeres kristályosítási módszerünk, a módszerek szisztematikus átvizsgálása folyamatban van. Sikerült mikrokristályokat előállítani, melyek azonban nem alkalmasak diffrakciós kép készítésére.

A kísérleti nyúlként használt citokróm  $c_4$  fehérjét viszont sikeresen kristályosítottuk.

### ***Kimutattuk, hogy szubsztrát limitált körülmények között a hidrogenáz reakció oszcillál.***

Sikerült egy olyan kísérleti elrendezést kialakítanunk, melyben a hidrogenáz autokatalitikus reakciója oszcilláló reakcióvá módosul. Ez egy jelentős új felfedezés, ilyen jellegű oszcilláló folyamatot eddig még nem találtak.

Bár a folyamat minden részletét még nem ismerjük, várható volt, hogy szubsztrát limitált környezetben esetleg oszcilláló jelenségek léphetnek fel a reakció során, s valóban sikerült oszcilláló reakciókat létrehozni a hidrogén felvételi reakció során. A jelenség általában ugyanúgy indul mint a nem szubsztrát limitált esetben, de egy idő után a kék körök belseje fehéredni kezd. A környezeti feltételek változtatásával teljes oszcilláló és vonuló frontokat lehet létrehozni melyek több 10 percig, néhány esetben órákig is hullámzanak a reakcióedényben. Létrehozhatók cirkuláris hullámok, ebben az esetben két hullámfront a reakcióedényben körpályán halad, előállíthatók a reakcióedényben teljes hullámok is, mikor a reakcióedény egésze, vagy nagy része azonos ütemben oszcillál, s a teljes reakcióedény a kék és a fehér szín között változik. A jelenség okainak felderítése pillanatnyilag folyik, egyelőre nem tudjuk megjósolni, hogy melyik mintázat fog egy adott reakcióban kialakulni.

A jelenséget nem vékonyrétegben is sikerült kimutatnunk, több napos oszcillációk alakultak ki.

### **Szcientometriai eredményeink**

Kísérleti eredményeinkből 6 publikáció született. Ezek összesített impakt faktora 21.86. Egy publikációnk (az oszcilláló reakcióról) kéziratban van. Az eredmények még több további publikáció alapját képezhetik, melyekhez további kísérletekre van szükség. 9 nemzetközi és 3 hazai konferencián tartottunk előadást.

### **Oktatási eredmények**

A pályázat három PhD dolgozatot eredményezett. Ősz Judit 2005-ben, Rui Miguel Mamede Branca 2008-ban, Pankotai-Bodó Gabriella pedig 2009-ben szerzett PhD fokozatot.