

**A *Thiocapsa roseopersicina*[NiFe]-
hidrogenázainak szerepe a sejt
metabolikus folyamataiban**

Ph.D. Tézisek

Maróti Judit

Témavezetők:

Prof. Kovács L. Kornél
Dr. Rákhely Gábor

MTA Szegedi Biológiai Központ, Biofizikai Intézet
Szegedi Tudományegyetem, Biotechnológiai Tanszék

Szeged

2010

Bevezetés

A mikrobiális hidrogén anyagcsere meghatározó komponensei a hidrogenáz enzimek, melyek a molekuláris hidrogén reverzibilis oxidációját katalizálják. Túlnyomórészt prokariótákban fordulnak elő, de alacsonyabbrendű eukarióták (algák) sejtszerveiben is előfordulnak. A molekuláris hidrogén energia és elektronforrás a kemolitotróf módon növekvő sejtek számára, míg az anaerob körülmények közt fermentatív anyagcserét folytató mikroorganizmusok gyakran szabadulnak meg a felesleges elektronoktól hidrogén formájában.

A jelenleg ismert hidrogenázok három csoportba sorolhatók: [NiFe]-hidrogenázok, [FeFe]-hidrogenázok és [Fe]-hidrogenázok. A [NiFe]-hidrogenázokra jellemző, hogy két alegységből álló heterodimert alkotnak. Ez egy elektronokat továbbító kis alegységből (kb. 30 kDa), és az aktív centrumot hordozó nagy alegységből (kb. 60 kDa) áll össze. Az aktív centrum egyedi felépítésű, egy-egy Ni, Fe, CO és két CN^- csoportból épül fel. A kétatomos csoportok a Fe atomon találhatóak, és a két fémet a nagy alegység négy konzervált ciszteinje koordinálja. A kis alegység vas-kén kockákat hordoz, melyek az elektronok továbbításában vesznek részt az aktív centrum és az *in vivo* elektron donor/akceptor között. A proximális [4Fe-4S] kocka képes a közvetlen elektron átvételre/átadásra a katalitikus centrummal, mindkettő mélyen a fehérjekomplex belsejében található.

A *Thiocapsa roseopersicina* BBS egy Gram-negatív, anaerob fototróf, bíbor kénbaktérium, amely a Chromatiaceae családba tartozik. Számos [NiFe] hidrogenázát (HynSL, HupSL és HoxEFUYH) azonosították és jellemezték korábban, ezek mind lokalizációjukban, mind *in vivo* funkciójukban és stabilitási tulajdonságaikban eltéréseket mutatnak. A *T. roseopersicina* teljes genomszekvenálása egy további, korábban ismeretlen [NiFe] hidrogenáz génszintű jelenlétét bizonyította. A törzs tehát különleges hidrogenáz hálózattal rendelkezik, és hidrogén metabolizmusának komplexitása is egyedülálló. Általános cél ezen hidrogenáz hálózat fiziológias szerepének feltárása, az egyes hidrogenázok bioszintézisének, kifejeződésének, funkciójának molekuláris szintű vizsgálata. E munka specifikus céljai a következők voltak:

A HupC fehérje szerepének vizsgálata, mely információt szolgáltat a HupSL enzim pontos *in vivo* funkciójáról.

A Hox2 hidrogenáz enzim részletes jellemzése, szerveződésének, aktivitási és expressziós tulajdonságainak vizsgálata, fiziológias szerepének tisztázása.

A Hox1 és Hox2 hidrogenázok összehasonlító elemzése.

Módszerek

A DNS manipulációs eljárásokat az általános gyakorlatnak, illetve az egyes gyártók utasításainak megfelelően végeztem. A plazmidokat *E. coli*-ba transzformálással illetve elektroporálással, *T. roseopersicina*-ba konjugációval juttattam be. Vizsgálataimhoz mutációs analízist, különböző hidrogenáz aktivitásmérési technikákat, valós idejű kvantitatív PCR kísérleteket használtam. Első lépésként deléciót hoztam létre a *hupC* és *hox2H* génekben, majd ezen mutációkat a megfelelő géneket plazmidon visszajuttatva komplementáltam. Részletesen tanulmányoztam a mutáns törzsek hidrogénfejlesztő és hidrogénfelvevő képességét mind *in vivo* (élő sejteken) mind *in vitro* (sejtpreparátumokon). Kvantitatív PCR-t alkalmaztam a *hox2* gén kifejeződésének követésére különböző körülmények között illetve különböző törzseket vizsgálva. A Hox2 enzimkomplex funkcionális vizsgálatának fontos részét képezték a szubsztrátok mennyiségének időbeli változását követő mérések, különös hangsúlyt fektetve a glükóz és tioszulfát szintek változásának nyomon követésére a baktériumok növekedése során.

Eredmények

T. roseopersicina hidrogén anyagcseréjében számos [NiFe]-hidrogenáz játszik szerepet. Ezek az enzimek a sejt különböző bioenergetikai/redox folyamataival állnak kapcsolatban. Munkám során a membránkötött Hup hidrogenáz elektron transzport alegységét (HupC) illetve a szolubilis Hox2 hidrogenázt vizsgáltam. Kísérleteim eredményeit az alábbi állításokban foglalom össze:

A HupC fehérje szerepének vizsgálatához *ΔhupC* deléciós mutáns törzset készítettem. Bizonyítottam, hogy a HupC elektrontovábbító alegységként része az *in vivo* funkcionális Hup hidrogenáz komplexnek. Emellett szükséges a Hup hidrogenáz stabilitásához és membránhoz való kötődéséhez.

A HupC fehérje hiánya hatással van a *hupSL* gén expressziós szintjére. Hiányában feltételezhetően elzáródik az elektronok útja a Hup hidrogenáztól a kinonraktár irányába, az oxidáltabb állapotú kinonraktár pedig pozitívan regulálhatja a Hup hidrogenázt kódoló géneket.

Bizonyítottam, hogy a sejtek számára rendelkezésre álló külső elektron forrás (tioszulfát) mennyisége a tápoldatban szintén befolyásolja a *hupSL* gén expresszióját. Ez a regulátor hatás valószínűleg a kinonraktáron keresztül realizálódik.

A *T. roseopersicina* genomjában azonosítottam heterotetramer citoplazmatikus [NiFe]-hidrogenáz génjeit (*hox2FUYH*) és egy feltehetően Hox2 specifikus endopeptidázt kódoló gént (*hox2W*).

Optimalizáltam a növesztési körülményeket a Hox2 hidrogenáz *in vivo* aktivitásának mérhetőségéhez. Csökkentett tioszulfát koncentráció (2 g L^{-1}) és glükóz egyidejű jelenléte szükséges és elégséges feltételek a Hox2 hidrogenáz mérhető *in vivo* aktivitásának megjelenéséhez. A Hox2 által katalizált hidrogéntermelés fotomixotróf növesztési körülmények között a stacioner növekedési fázisban jelenik meg.

Vizsgáltam a tioszulfát és a glükóz Hox2 hidrogenáz aktivitásában játszott szerepét. Kimutattam, hogy a tioszulfát a sejtek által használt elsődleges elektronforrás az exponenciális növekedési fázisban. A stacioner fázisban a glükóz veszi át ezt a szerepet és a glikolízisből származó elektronok használja - a már korábban szintetizálódott - Hox2 hidrogenáz a hidrogén termeléshez.

Bizonyítottam, hogy a Hox2 egy valóban két irányban működő hidrogenáz – ami képes az *in vivo* hidrogéntermelést és felvételt is katalizálni. Az enzim a citoplazmában lokalizálódik és képes *in vitro* NADH- (de nem NADPH-) függő hidrogén termelésre.

Az expressziós vizsgálatok eredményei a hidrogenáz (*hox2YH*) és diaforáz (*hox2FU*) alegységeket kódoló gének eltérő expressziós

szintjét tárták fel, ami két transzkripciós egységre vagy a *hox2FU* és *hox2YH* géneket hordozó mRNS eltérő stabilitására utal. A *hox2YH* transzkript jelentősen alacsonyabb szintje magyarázhatja a Hox2 hidrogenáz alacsony hidrogéntermelő képességét. A *hox2* gének eltérő transzkript szintje a vad típusú és a $\Delta hyn, \Delta hup, \Delta hox1H$ hidrogenáz mutáns törzsekben a jelenlévő hidrogenázok közötti összehangolt működésre utal.

Megvizsgáltam a szerkezeti különbségeket a Hox1 és Hox2 hidrogenázok között, melyek a Hox-típusú hidrogenázok csoportjának egy négy és egy öt alegységes tagját képviselik *T. roseopersicina*-ban. Két működőképes, strukturális felépítésében különböző Hox-típusú hidrogenáz egyidejű jelenléte egy organizmusban mindezidáig egyedülálló.

Bemutattam, hogy a Hox1 hidrogenáz hidrogéntermelő aktivitása nagymértékben meghaladja a Hox2 enzimét és a *hox1YH* gének expressziós szintje is jelentősen magasabb mint a *hox2YH* géneké. Ez a különbség a diaforáz alegységeket kódoló gének esetén nem észlelhető.

Bizonyítottam, hogy a Hox2 hidrogenáz csak a glikolízis kezdete után válik metabolikusan aktívvá, míg a Hox1 egyaránt képes glükózt és tiosulfátot elektrondonorként felhasználni hidrogéntermelés során.

Közlemények

A disszertáció alapjául szolgáló közlemények:

Maróti, J., Farkas, A., Nagy, I. K., Maróti, G., Kondorosi, É., Rákhely, G. and Kovács, K. L. (2010) Second soluble Hox-type NiFe enzyme completes the hydrogenase set in *Thiocapsa roseopersicina* BBS. *Appl. Environ. Microbiol.* (In press)

Palágyi-Mészáros, L. S., Maróti, J., Latinovics, D., Balogh, T., Klement, E., Medzihradzsky, K.F., Rákhely, G. and Kovács, K. L. (2009) Electron-transfer subunits of the NiFe hydrogenases in *Thiocapsa roseopersicina* BBS. *FEBS J.* **276(1)**:164-174.

További közlemények:

Maróti, G., Rákhely, G., Maróti, J., Dorogházi, E., Klement, E., Medzihradzsky, F. K. and Kovács K. L. (2010) Specificity and selectivity of HypC chaperonins and endopeptidases in the molecular assembly machinery of [NiFe] hydrogenases of *Thiocapsa roseopersicina*. *Int. J. Hydrogen Energy* **35**: 3358-3370.

Kovács, K. L., Kovács, A. T., Maróti, G., Mészáros, L. S., Balogh, J., Latinovics, D., Fülöp, A., Dávid, R., Dorogházi, E. and Rákhely, G. (2005) The hydrogenases of *Thiocapsa roseopersicina*. *Biochem. Soc. Trans.* **33**:61-63.

Kovács, A. T., Rákhely, G., Balogh, J., Maróti, G., Fülöp, A. and Kovács, K. L. (2005) Anaerobic regulation of hydrogenase transcription in different bacteria. *Biochem. Soc. Trans.* **33**:36-38.

Kovács, A. T., Rákhely, G., Balogh, J., Maróti, G., Cournac, L., Carrier, P., Mészáros, L. S., Peltier, G., Kovács, K. L. (2005) Hydrogen independent expression of *hupSL* genes in *Thiocapsa roseopersicina*. *FEBS J.* 272: 4807-4816.

Kovács, K. L., Fodor, B., Kovács, Á. T., Csanádi, Gy., Maróti, G., Balogh, J., Arvani, S. and Rákhely, G. (2002) Hydrogenases, accessory genes and the regulation of [NiFe] hydrogenase biosynthesis in *Thiocapsa roseopersicina*. *Int. J. Hydrogen Energy*, 27:1463-1469.

Kovács, K. L., Kovács, Á. T., Maróti, G., Bagi, Z., Csanádi, Gy., Perei, K., Bálint, B., Balogh, J., Fülöp, A., Mészáros, L. S., Tóth, A., Dávid, R., Latinovics, D., Varga, A. and Rákhely, G. (2004) Improvement of biohydrogen production and intensification of biogas formation. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 3(4): 321-330.

Társszerzői lemondó nyilatkozat

Kijelentjük, hogy Maróti Judit „*Thiocapsa roseopersicina* [NiFe]-hidrogenázainak szerepe a sejt metabolikus folyamataiban” című Ph.D. téziseiben foglalt tudományos eredményeket tudományos fokozat megszerzéséhez nem használtuk fel, és későbbiekben sem fogjuk felhasználni.

Kijelentjük, hogy a tézisekben és az értekezésben szereplő és közösen publikált eredményekben Maróti Judit szerepe meghatározó fontosságú volt.

Dr. Rákhely Gábor

Prof. Kovács Kornél

Dr. Maróti Gergely

Latinovics Dóra

Balogh Timea

Nagy Ildikó

Farkas Attila

Szeged, 2010. 05. 31.