

**Ph.D tézisfüzet**

**A hidrogenázok és a kénanyagcsere kapcsolatának jellemzése  
fototróf bíbor kénbaktériumokban.**

Tengölics Roland  
Biológia Doktori Iskola

Témavezető:  
Dr. Rákhely Gábor  
Egyetemi docens

Szegedi Tudományegyetem, Biotechnológiai Tanszék



Szeged

**2014.**

## Bevezetés

Napjainak egyik legfontosabb problémája az egyre nehezebben elérhető energiahordozók. A fosszilis energiahordozókról megújulóakra való áttérésben lehet szerepe a biohidrogénnek, ami előállítható foto- és sötét fermentációval hidrogenáz vagy nitrogenáz enzimek segítségével egyaránt. A legideálisabb megoldás a hidrogén fotoautotróf körülmények közti előállítása, egy olyan mikroorganizmussal, ami fotoszintetikus aktivitása során oxigént nem termel, ezáltal hidrogéntermelése hosszútávon fenntartható. Ilyen mikrobák a bíbor kénbaktériumok, melyek ciklikus elektrontranszporttal rendelkeznek és anaerob fotoszintézisükhöz elektrondonorként leginkább kénvegyületeket használnak.

Modellorganizmusunk a *Thiocapsa roseopersicina* BBS, ami egy fototróf bíbor kénbaktérium, képes kizárólag szerves anyagokat felhasználva hidrogenáz és nitrogenáz enzimek segítségével egyaránt hidrogéntermelésre. Modellorganizmusunkban négy aktív [NiFe] hidrogenáz van, ezek közül kettő membrán asszociált: A Hyn és a kizárólag hidrogén felvételi irányban működő Hup. A Hyn hidrogenáz egy figyelemreméltó stabilitással rendelkező kétirányú hidrogenáz, aminek van két elektrontranszfer alegysége, a transzmembrán Isp1 és membrán asszociált citoplazmatikus orientációjú Isp2. A másik két hidrogenáz a Hox1 és a Hox2 citoplazmatikus NAD<sup>+</sup> redukáló enzimek. A Hox1 nem csak fényben, hanem sötétben is képes hidrogéntermelésre.

## Célkitűzések

- A Hyn hidrogenáz fiziológiás elektron donorjainak és akceptorainak megkeresése. Megállapítani, azok azok milyen hierarchikus viszonyban állnak egymással.
- *T. roseopersicina* fotoautotróf körülmények között végbemenő hidrogéntermelésében és a hidrogénfelvételben szerepet játszó fiziológiás elektrontranszport útvonalak feltárása.
- A hidrogenázhoz kapcsolódó anyagcsere útvonalak vizsgálata *in silico* módszerekkel, fókuszálva a kénanyagcserében szerepet játszó fehérjék génjeire.
- Megválaszolni azt a kérdést, hogy a Hyn hidrogenáz miként kapcsolódik a membrán redox rendszerhez / fotoszintetikus elektrontranszport lánchoz. Továbbá mi a szerepe a Hyn hidrogenáz Isp2 alegységének a hidrogenáz membrán redox rendszerhez való kapcsolatban.
- A fotoszintetikus elektrontranszport lánc szerepnek vizsgálta a Hyn hidrogenáz hidrogéntermelésében, az elektrondonáció és a protongrádiens képzés szempontjából.
- Megállapítani, mely vegyületek a fotoautotróf körülmények közti hidrogéntermelés elektron donorjai Hox1 hidrogenáz esetében, ezek milyen hierarchikus viszonyban állnak egymással, és a kapott eredmények milyen viszonyban állnak a Hyn hidrogenáz esetén tapasztaltnal.
- Megvizsgáljam, a Hox1 hidrogenáznak mi a szerepe a sejtanyagcserében.
- Integrált modell felállítása a Hyn és Hox1 hidrogenázok kénanyagcsere / membrán elektron transzport kapcsolatáról.

**Felhasznált módszerek:**

Kénanyagcserében szerepet játszó gének keresése és annotálása genomi szekvencia alapján BLAST segítségével. DNS manipulációs technikák segítségével történő konstrukcióépítés. A leolvasási keret megtartásával történő mutagenézis és homológ komplementáció. H<sub>2</sub> hidrogenáz mennyiségének meghatározása Western analízis segítségével. Különböző elektron donorok és akceptorok jelenlétében hagyományos mikrobiológiai technikák segítségével történő *in vivo* hidrogéntermelés és visszavétel mérése. *In vivo* kénhidrogén termelés, és szulfát mennyiség meghatározása gáz és folyadék kromatográfia segítségével.

## Eredmények

- Megállapítottam, hogy a Hyn hidrogenáz hidrogéntermelése kizárólag elemi kén és tioszulfát jelenlétében valósul meg.
- A Hyn hidrogenáz hidrogéntermelése fényfüggő.
- A két hidrogéntermelést serkentő útvonal közül úgy tűnik, hogy - a Hyn esetén - a tioszulfát asszimiláció a jobb elektrondonor.
- A Hyn hidrogenáz hidrogéntermelésében nincs domináns szerepe a kinon raktárba elektronokat juttató szulfid asszimilációnak és szulfit oxidációnak.
- Nemcsak az elemi kén képes a Hyn függő hidrogénfelvétel gyorsítására, hanem a nitrát is, ez alapján a Hyn nem közvetlenül a kénanyagcseréhez, hanem a membrán elektron transzportlánchoz kapcsolódik.
- A Hyn- és hidrogénfüggő kénhidrogén termelés terbutrinnal történő gátlása alapján, a Hyn hidrogenáz a fotoszintetikus elektrontranszport láncsal kétirányú kapcsolatban van.
- A fotoszintetikus elektron transzportlánc által előállított protongrádiensnek szerepe van a Hyn hidrogenáz hidrogéntermelésében.
- Leolvasási keret elrontása nélküli mutagenézissel elkészítettem a Hyn Isp2 alegységét nem tartalmazó törzset.
- Isp2 hiányában megszűnt a Hyn hidrogenáz hidrogéntermelése és a hidrogénfüggő kénhidrogén termelés egyaránt, tehát az Isp2 része a Hyn és membrán redox rendszer közti elektron transzportláncának.
  
- A Hox1 hidrogenáz hidrogéntermelése fotoszintetikus körülmények között elemi kén oxidációjához illetve a kinonokat redukáló szulfioxidációhoz kapcsolatan egyaránt végbe megy.
- A Hox1 hidrogenáz kinonraktárhoz való kapcsoltságát alátámasztja, hogy a Hox1 hidrogéntermelése és a kénhidrogén termelés kompetitív folyamatok.
- A Hox1 feladata a membrán redox rendszer túlredukciója elleni védelem lehet.

**Az eredményeim alapján felállított, a Hyn és Hox1 hidrogenázok elektrontranszport kapcsolatait leíró modell:**

A kénoxidáció és tioszulfát asszimiláció során felszabaduló elektronok a periplazmatikus citokróom molekulákon keresztül fényenergia segítségével jutnak a fotoszintetikus elektrontranszport láncba. Az elektronok a  $Q_b$  helyről kilépve egy máig ismeretlen redox molekulát redukálnak. Ez a redox aktív molekula juttatja az elektronokat a Hyn Isp2 alegységére. Innen az elektronok a hidrogenáz katalitikus alegységre kerülnek, ahol a protonokkal rekombinálódva hidrogén képződik. Ezen folyamat részben protongrádienst igényel. Hidrogénfelvétel esetén az Isp2 alegységen keresztül redukálódik az elektronhordozó molekula, ami továbbadja az elektront a fotoszintetikus reakciócentrum  $Q_b$  helyére. Innen az elektron a kinon raktárba kerül, ahonnan az kénredukcióra vagy nitrátredukcióra fordíthat.

Ezzel szemben a Hox1 hidrogenáz megvilágítás alatt a tioszulfát asszimilációból, és a szulfid oxidációból is kaphat elektronokat a kinon raktáron keresztül. Szerepe pedig a membránredox rendszer túlredukciója, és túlzott kénhidrogén termelés elleni védelem lehet.

## **Köszönetnyilvánítás**

Köszönetet szeretnék mondani az SZTE Biotechnológiai Tanszék és az MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont Biofizikai Intézet minden dolgozójának, hogy segítették munkámat.

Szeretném megköszönni Dr. Rákhely Gábornak, hogy egyetemi és Ph.D. tanulmányaim alatt irányítása alatt dolgozhattam. Köszönöm értékes szakmai tanácsait, bátorítását és támogatását. Prof. Kovács Kornélnak, hogy lehetővé tette munkámat a Biotechnológiai Tanszéken. Külön köszönet illeti Dr. Mészáros Líviát, aki munkám kezdete során segített, megismertetett a projekthez tartozó alapvető molekuláris biológiai technikákkal. Hálás vagyok Doffkay Zsoltnak, és Győri Editnek munkámhoz nyújtott önzetlen segítségükért, nélkülük ez a dolgozat nem készülhetett volna el.

Köszönöm a sok hasznos beszélgetést Dr. Tóth Andrásnak, Nyilasi Andreáknak, Dr. Fülöp Andrásnak, Dr. Maróti Gergelynek, továbbá Dr. Nagy Lászlónak az SZTE Biofizikai Tanszékén és Dr. Kovács Lászlónak és Dr. Garab Győzőnek az MTA SZBK Növénybiológia Intézetében.

Továbbá hálával tartozom családomnak, akik tanulmányaim során mindvégig bíztattak, támogattak, akikre szintén mindig számíthattam.

Nem felejtetem el megköszönni azon szervezeteknek sem, akik ösztöndíjakkal támogatták munkámat: Federation of European Biochemical Societies, Federation of European Microbiological Societies.

Továbbá a kutatás a TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 Nemzeti Kiválóság Program című kiemelt projekt keretében zajlott. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.

## Saját közlemények jegyzéke:

### Közlemények melyek a dolgozat alapját képezték:

Tengölics, R., Mészáros, L., Doffkay, Zs., Győri, E., Kovács, K.L., Rákhely G. (2014) Connection between the membrane electron transport system and Hyn hydrogenase in the purple sulfur bacterium, *Thiocapsa roseopersicina* BBS *Biochim Biophys Acta*. 2014 Aug 8;1837(10):1691-1698. doi: 10.1016/j.bbabi.2014.07.021. IF: 4,829

Fülöp, A., Béres, R., Tengölics, R., Rákhely, G., és Kovács, K. L. (2012). Relationship between PHA and hydrogen metabolism in the purple sulfur phototrophic bacterium *Thiocapsa roseopersicina* BBS. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(6), 4915–4924. doi:10.1016/j.ijhydene.2011.12.019 IF: 3,548

### Közlemények melyek nem képezték a dolgozat alapját

Tuboly, E., Szabó, A., Erős, G., Mohácsi, A., Szabó, G., Tengölics, R., ... Boros, M. (2013). Determination of endogenous methane formation by photoacoustic spectroscopy. *Journal of Breath Research*, 7(4), 046004. doi:10.1088/1752-7155/7/4/046004 IF: 2,57

Nagy, V., Tengölics, R., Schansker, G., Rákhely, G., Kovács, K. L., Garab, G., és Tóth, S. Z. (2012). Stimulatory effect of ascorbate, the alternative electron donor of photosystem II, on the hydrogen production of sulphur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(10), 8864–8871. doi:10.1016/j.ijhydene.2012.02.002 IF:3,548

Boboescu, I. Z., Gherman, V. D., Mirel, I., Pap, B., Tengölics, R., Rákhely, G., Maróti, G. (2014). Simultaneous biohydrogen production and wastewater treatment based on the selective enrichment of the fermentation ecosystem. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(3), 1502–1510. doi:10.1016/j.ijhydene.2013.08.139 IF:3,548

**Összesített impakt faktor:18,049**



## **Fontosabb egyéb közlemények - Konferencia előadások - Poszterek**

INDUSTRIAL MICROBIOLOGY FOR THE PRODUCTION OF BIOHYDROGEN AND BIOGAS  
KORNÉL L. KOVÁCS, Z. BAGI, E. KOVÁCS, G. MARÓTI, E. SZÓRI-DOROGHÁZI, N. ÁCS, R.  
WIRTH, R. TENGÖLICS, A. FÜLÖP, G. RÁKHELY Acta Immunologica Hungarica 16<sup>th</sup>  
International Congress of the Hungarian Society for Microbiology 2011 Keszthely. If:  
0,6

SIMULTANEOUS BIOHYDROGEN PRODUCTION AND WASTEWATER TREATMENT  
BASED ON THE SELECTIVE ENRICHMENT OF THE FERMENTATION ECOSYSTEM Iulian  
Zoltan Boboescu, Vasile Daniel Gherman, Ion Mirel, Bernadett Pap, Roland Tengölics,  
Gábor Rákhely, Éva Kondorosi and Gergely Maróti IREC 2012, The International  
Renewable Energy Congress Paper

### **Konferencia előadások:**

Connection between sulfur metabolism and Hyn hydrogenase of *Thiocapsa roseopersicina*. Roland Tengölics, Lívia Mészáros, Tünde Csata, Márta Ondrészik, Edit Györi, Kornél Kovács and Gábor Rákhely Bacterial Electron Transport and it's Regulation

Hydrogenase related metabolic networks in *Thiocapsa roseopersicina* Roland Tengölics, Rita Béres, Zsolt Doffkay, Tünde Csata, János Orosz, Sebestyén Simonkovich, Márta Ondrészik, Edit Györi, Kornél L. Kovács and Gábor Rákhely 10<sup>th</sup> Hydrogenase Conference Szeged,

### **Poszterek:**

Connections between sulfur metabolism and Hyn hydrogenase of *Thiocapsa roseopersicina* BBS. Roland Tengölics, Lívia Mészáros, Zsolt Doffkay, András Tóth, Ágnes Duzs, Edit Györi, Kornél Kovács, and Gábor Rákhely. EMBO Workshop on Microbial Sulfur Metabolism.