

**Szulfid és arzén alapú alternatív anyagcsere utak tanulmányozása
a *Synechocystis sp.* PCC6803 cianobaktériumban**

Ph. D. értekezés

Nagy Csaba István

Szeged

2014

Szulfid és arzén alapú alternatív anyagcsere utak tanulmányozása a

***Synechocystis sp. PCC6803* cianobaktériumban**

Ph. D. értekezés

Nagy Csaba István

Témavezetők:

Dr. Vass Imre

Dr. Kós Péter

Biológia Doktori Iskola

MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont Növénybiológia Intézet

SZTE TTIK

Szeged

2014

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	6
1. Bevezetés.....	7
2. Irodalmi áttekintés	9
2.1. A cianobaktériumok általános jellemzése, földtörténeti és evolúciós jelentőségük.....	9
2.2. A szulfid-kinon oxidoreduktáz enzimek	13
2.2.1. A hidrogén-szulfid eredete és toxicitása.....	13
2.2.2. A szulfid-kinon oxidoreduktázok az élővilágban.....	14
2.2.3. Cianobakteriumok hidrogén–szulfid alapú alternatív fotoszintézise	18
2.2.4. Cianobaktériumok szulfid-kinon oxidoreduktázainak morfológiai, szerkezeti és biokémiai jellemzése	19
2.2.5. Az SQR gének szabályzása	24
2.2.6. A <i>Synechocystis</i> 6803 szulfid:kinon reduktázok.....	24
2.3. Az arzén biológiai vonatkozásai.....	26
2.3.1. Arzén a természetben.....	26
2.3.2. Az arzén toxicitásának mechanizmusa	27
2.3.3. Az arzén felvétele és szállítása a sejtekben.....	27
2.3.4.1. A <i>Synechocystis</i> arzén rezisztencia rendszere	30

2.3.5. Arzén-alapú anyagcsere folyamatok	31
3. Célkitűzések	33
4. Anyagok és módszerek	35
4.1. A <i>Synechocystis sp.</i> PCC6803 nevelési és kísérleti körülményei	35
4.2. Anaerob kísérleti körülmények	35
4.3. Klónozási eljárások és a <i>Synechocystis</i> mutánsok létrehozása	36
4.3.1. A Δ <i>suoT</i> mutáns vonal elkészítése	36
4.3.2. A Δ <i>suoR</i> mutáns vonal elkészítése.....	37
4.3.3. A Δ <i>suoRSCT</i> mutáns vonal elkészítése	38
4.4. A <i>Synechocystis</i> sejtek transzformálása	39
4.5. Génexpresszió mérés	39
4.6. A <i>Synechocystis</i> nehézfémekkel való kezelése a <i>suoT</i> gén expresszójának a méréséhez	40
4.7. A hidrogén-szulfid gázkromatográfiás mérése.....	41
4.8. A SuoS fehérje szulfid–kinon oxidoreduktáz aktivitásának spektrofotometriás tanulmányozása	41
4.9. A <i>suoR</i> gén klónozása, expressziója és a SuoR fehérje tisztítása.....	42
4.10. Elektroforetikus mobilitás-eltolódás vizsgálata (EMSA)	43
4.11. Arzén-rezisztencia mérés	44
4.12. Az intracelluláris arzén tartalom meghatározása.....	44

4.13. <i>In silico</i> kísérletekhez használt online adatbázisok és szoftverek	45
5. Eredmények.....	48
5.1. A <i>suoRSCT</i> gének és genetikai környezetének <i>in silico</i> tanulmányozása.	48
5.2. A <i>SuoS</i> SQR enzim genetikai és fiziológiai jellemzése	55
5.2.1. A <i>suoRSCT</i> operon expressziójának és génszabályozásának a vizsgálata	55
5.2.2. A <i>SuoS</i> SQR enzim redox funkciójának a tanulmányozása	58
5.2.3. A <i>SuoS</i> SQR enzim elektron donor félreakciójának a tanulmányozása.....	60
5.2.4. A <i>suoS</i> SQR gén szabályzásának a vizsgálata	64
5.3. A <i>SuoT</i> membránfehérje arzén anyagcserében betöltött szerepének vizsgálata	66
5.4. A <i>suoRSCT</i> operon evolúciós eredetének a vizsgálata	70
6. Az eredmények megvitatása.....	73
7. Következtetések.....	78
8. A dolgozatban felhasznált közlemények.....	80
Irodalomjegyzék	82
Összefoglalás	93
Summary	97
Köszönetnyilvánítás.....	101

Rövidítések jegyzéke

As(III) - hármas oxidációs számú arzén; kísérleteinkhez nátrium-**arzenitet** (NaAsO_2)

használtunk hatásának tanulmányozásához

As(V) - ötös oxidációs számú arzén; kísérleteinkhez nátrium-**arzenátot** (Na_2HAsO_4)

használtunk hatásának tanulmányozásához

DCMU - 3-(3,4-Diklorofenil)-1,1-dimetilurea

EMSA - Electrophoretic mobility shift assays (Elektroforetikus mobilitás-eltolódás vizsgálat)

FAD - flavin adenin dinukleotid

pBS - pBluescript II SK+ klónozó plazmid

PCR - polimeráz láncreakció

PSI - egyes fotokémiai rendszer

PSII - kettes fotokémiai rendszer

OD - optikai sűrűség

PQ-1- egy izoprén egységet tartalmazó plasztokinon

qRT-PCR - kvantitatív valós idejű reverz transzkripció-polimeráz láncreakció

SQR - szulfid-kinon oxidoreduktáz enzim

WT - vad típus

1. Bevezetés

Az élő szervezetek Földön való megjelenésének kezdetén, a cianobaktériumok elterjedése és a víz bontásán alapuló fotoszintézis kialakulása előtt a bolygó élettereiben nagy koncentrációban fordultak elő különböző kémiai elemek redukált vegyületei. Ezek a redukált kén- (1,2), arzén- (3), nitrogén- (4) vagy vasvegyületek (5,6) energiaforrásként szolgáltak különböző kemo- és fotoautotróf prokarioták számára. Azok a fotoautotróf szervezetek, amelyek hidrogén-szulfid bontásából állították elő az ATP szintézishez szükséges protongrádienszt egy szulfid-kinon oxidoreduktáz, köztes enzimek és PSI típusú fotokémiai rendszer segítségével valósították meg a fotofoszforilációt (7). Azok a mikroszervezetek pedig, amelyek redukált arzénvegyületeket használtak elektron donorként, egy arzenit-oxidáz enzim, megfelelő kinonok és akceptor molekulák segítségével biztosították anyagcserefolyamataikat (8,9).

Mindamellet, hogy a szulfid-kinon oxidoreduktáz (SQR) enzimen alapuló fotoszintézis mindmáig fennmaradt a zöld kénbaktériumokban, bíbor kénbaktériumokban és bíbor nem-kén baktériumokban, az SQR enzim a magassabbrendű növényeket kivéve az egész élővilágban elterjedt (10). A cianobaktériumok „növényi típusú” fotofoszforiláció útján nyerik a szükséges ATP-t de a vízi környezetben gyakran magas koncentrációjú szulfid a PSII fotokémiai rendszert gátolja (11). Egyes cianobaktériumok azonban szulfid jelenlétében képesek áttérni „bakteriális típusú”, SQR-en alapuló alternatív fotoszintézisre, amiben a H₂O helyett a hidrogén-szulfid szolgáltatja az elektronokat (12).

Annak ellenére, hogy az arzén toxikus vegyületként él a köztudatban, számos olyan baktériumról számolt be a szakirodalom az utóbbi években, amelyek arzén alapú anyagcserét folytatnak. Az a korábbi elképzelés, miszerint ezek az arzént-léggző vagy fotoszintézisükhöz

arzént használó baktériumok különleges, egzotikus életformák lennének, módosult jelenlegi kutatások tükrében. Ezek a kutatások rámutattak arra, hogy lényegében az arzenit–oxidázok az egyik legősibb, utolsó univerzális közös ős előtti (Last Universal Common Ancestor: LUCA (13,14)) földtörténeti korszakból származó enzimesoportot képviselik (9).

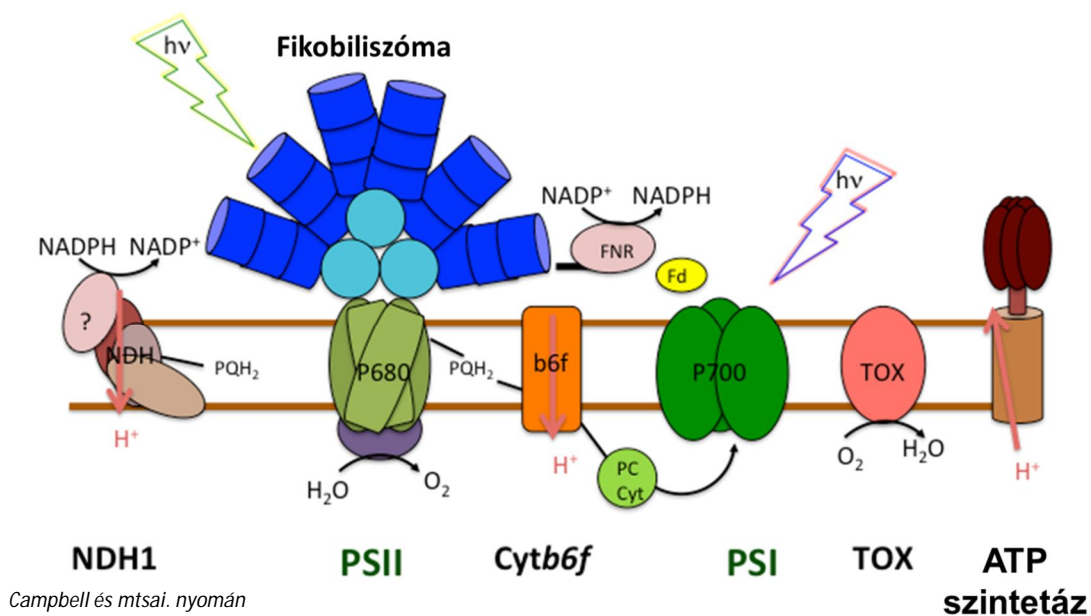
A *Synechocystis* sp. PCC6803 cianobaktérium genomszekvenciájának *in silico* tanulmányozása során észrevettük, hogy az tartalmaz egy szulfid–kinon oxidoreduktáz enzimet kódoló gént, ami egy arzén–specifikus represszor közvetlen közelében helyezkedik el. Ezek a gének egy operont alkotnak és a következő nyitott leolvasási keretként vannak nyilvántartva a Cyanobase adatbázisban: sl15035, sl15036, slr5037 és slr5038. Mivel feltételeztük, hogy a gének szulfid oxidációval hozhatók kapcsolatba *suoR*, *suoS*, *suoC* és *suoT*-nek neveztük őket. A *suoR* terméke nagyfokú homológiát mutat az ArsR fehérjecsald regulátoraival, amelyek különböző baktériumok arzén-rezisztencia génjeinek a kifejeződését szabályozzák. A *suoS* terméke aktív szulfid-kinon oxidoreduktázokkal mutat hasonlóságot. A *suoC* egy konzervált, de nem azonosított funkciójú géncsaláddal mutat közeli rokonságot. A *suoT* pedig annak ellenére, hogy egy kromát transzportert kódoló génként van nyilvántartva az adatbázisban, feltételezésünk szerint arzénszállításban játszhat szerepet.

A *suoRSCT* génekre illetve fehérje termékeikre vonatkozóan kísérletes adat nem állt eddig rendelkezésre. Cianobaktériumokban aktív SQR enzimekről nagyon kevés kísérletes adat ismert, és ilyen enzimeknek az arzén anyagcserével vagy arzén detoxifikációval való kapcsolatuk teljesen újszerű. Az aerob körülmények között élő cianobaktériumban ennek a szigorúan anaerob SQR enzimnek a jelenléte és a két anyagcsereút feltételezhető kapcsolata új információkat szolgáltat a cianobaktériumok evolúciójának, genetikai plaszticitásának és adaptációs képességének a megértéséhez valamint paleoökológiai kutatásokhoz.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A cianobaktériumok általános jellemzése, földtörténeti és evolúciós jelentőségük

A cianobaktériumok prokarióta típusú egysejtű szervezetek, amelyek feltehetően 3-3,5 milliárd évvel ezelőtt jelentek meg a földtörténeti archaikumban (15). Ezek az eubaktériumok az első olyan élőlények, amelyek képesek voltak felhasználni a vizet elektron forrásként a PSII típusú fotokémiai rendszerben kialakult vízbontó komplex révén (16) (1. ábra).



1. Ábra. A cianobaktériumok fotoszintetikus elektrontranszport rendszerének sematikus ábrázolása. Munkánk szempontjából a PSII, a PQ és a PSI szerepe bír kiemelt jelentőséggel. Az ábra Campbell és munkatársai nyomán (17) készült.

A víz oxidálásán alapuló fotoszintézis melléktermékeként felhalmozódó oxigén révén a cianobaktériumok átváltoztatták az ősi redukzív légkört oxidatív légkörré (18). Az oxigén

feldúsulása egyrészt előzménye volt az aerob életformák megjelenésének és az ózon réteg kialakulásának és ez által a szárazföldi élet létrejövetelének. Másrészt viszont az oxigén megjelenése a földtörténet egyik legnagyobb kihalási eseményét okozta, amit Oxigén Katasztrófának is neveznek. Kataláz és peroxidáz enzimek hiányában, az akkor uralkodó anaerob életformák – baktériumok és archeák – számára toxikus volt az egyre nagyobb koncentrációban feldúsuló, erősen reaktív kémiai elem, az oxigén (18).

A hozzávetőleg 3 milliárd éves evolúciójuk során a cianobaktériumok rendkívüli genetikai plaszticitásra, adaptációs képességre és változékonyságra tettek szert, miáltal számos szélsőséges környezeti feltételhez alkalmazkodtak és valamennyi élettérben elterjedtek (19). Annak ellenére, hogy legtöbb fajuk mezoterm, nagyon alacsony vagy igen magas hőmérsékletű vizekben is fellelhetők. Néhány fajuk arktikus környezetben, míg mások akár 70 °C-os termálvizekben, hőforrásokban, hévizekben élnek. A hőmérséklet mellett igen nagy a pH vagy a sótartalom tűréshatáruk is. Bár elsősorban vízi életterekben gyakoriak, valamennyi szárazföldi környezetben is elterjedtek: talajok felszínén, kősziklákon, sivatagban valamint sarki környezetben is fellelhetők (20).

Adaptációs képességük változatos anyagcseréjüknek is köszönhető. Mindamellett, hogy a legtöbb cianobaktérium fotoautotróf módon táplálkozik, számos faj képes heterotróf anyagcserére is. Fotoszintézisükhöz a víz mellett egyéb redukált vegyületeket is hasznosíthatnak elektron donorként, mint például a hidrogén-szulfidot (12), tioszulfátot (21) vagy molekuláris hidrogént (22). Fény hiányában pedig a fotoszintézis során felhalmozott tartalék szénhidrátot, a glikogént hasznosítják energiaforrásként. Fotoszintetikus elektrontranszportjuk kizárólag a tilakoid membránokban zajlik, míg a légzési folyamatok a tilakoidok mellett a plazmamembrán rendszeren keresztül is. Prokarioták lévén sejtjeik nem kompartmentalizálódtak, így légzési és fotoszintetikus elektrontranszportláncuk nem különül

el, feltehetőleg a plasztokion közvetíti az elektronokat a két elektrontranszportlánc között (23). A növényi eukarióta sejtek evolúciójának, kompartmentalizációjának viszont fontos láncszemei a cianobaktériumok. A kloroplasztiszok ugyanis a cianobaktériumoknak eukarióta sejtekben történő endoszimbiozisa révén alakultak ki (24). Szimbiózisra való hajlamuk a földtörténeti evolúció során mindvégig fennmaradt, bár más minőségben. Számos faj képes a légköri nitrogén megkötésére is (25). A legtöbb erre képes fajnál erre specializált sejtek, ún. heterociszták alakultak ki (26), amely biztosítja a nitrogénáz enzimek oxigénmentes miliójét. Nitrogén-kötő képességük és fotoautótrofiájuk miatt néhány fajuk szimbiózisban él más szervezetekkel (27), így korallokban (28), óriáslapukban (29), moszatpáfrányokban (30), alkotnak mutualista kapcsolatokat, valamint közismert a gombákkal való együttélésük a zuzmókban (31).

Paleobiogeokémiai kutatások azt mutatják, hogy a fotoszintézis mint fényfüggő energia nyerő folyamat már a cianobaktériumok megjelenése előtt kialakult (32,33). Az archaikum kezdeti, anaerob élettereiben az úgynevezett anoxigenikus fotoszintézis volt az uralkodó, amely oxigént nem termelt és főleg a PSI típusú fotokémiai rendszer működésén alapult. A vizet, mint redukált oxigént hasznosító fotoszintézis kialakulása előtt, különböző baktériumok elsősorban hidrogént hasznosítottak (34). Később kialakultak olyan enzimek, amelyek segítségével a hidrogén-szulfidot és számos egyéb redukált vegyületet, mint elektron donort tudtak használni. A redukált kénvegyületek mellett nitrogén- (4), vas- (5,6) vagy akár arzénvegyületeket (3) hasznosítottak fotolitotróf módon energianyeréshez. Anaerob bíbor kénbaktériumok (26,35), bíbor nem-kén baktériumok (36,37) és zöld kénbaktériumok (38) például egy szulfid-kinon oxidoreduktáz enzim segítségével és PSII illetve az utóbbiaknál PSI révén hasznosították a hidrogén-szulfidot. Érdekes megjegyezni, hogy olyan zöld kén

baktériumot is azonosítottak egy csendes-óceáni 2391 m mélyen levő fekete füstölőben, amely bár hidrogén-szulfidot használt elektron donorként, a fotoszintézishez a föld geotermális energiájának infravörös sugárzását használta fel (39). A hidrogén-szulfiddal és szulfid-kinon oxidoreduktázzal analóg módon egyes proteobaktériumok számára a redukált arzénvegyületek szolgáltak elektron donorként fotoszintézisükhöz: specifikus arzenit-oxidázuk segítségével hasznosították a redukált arzénvegyületeket, többek közt az As(III)-at, az arzenitet (3). Ezek a mai környezetben extrémnek tűnő fotoszintetikus anyagcsere folyamatok exobiológiai szempontból is érdekesek, ugyanis maradványai egy olyan anaerob földi környezetnek, amelyhez hasonlót egyre gyakrabban találnak a naprendszerünkben és azon kívül is (40). Az ilyen biológiai rendszerek tanulmányozása részben közelebb visz a földi élet kialakulásának megértéséhez, másrészt pedig kitágítja az ismert biogeokémiai folyamatok halmazát, új perspektívákat nyitva az exobiológiai kutatásokban is (40).

2.2. A szulfid-kinon oxidoreduktáz enzimek

2.2.1. A hidrogén–szulfid eredete és toxicitása

A hidrogén–szulfid egy színtelen, jellegzetesen „záptojás” szagú, a levegő gázainál nehezebb, erősen korrozív – a nemesfémeket is megtámadja –, gyúlékony, igen mérgező gáz (41). A természetben elsősorban vulkánok gázaiban, kénes ásványvizekben, termálvizekben, oxigénmentes környezetekben, mint például mocsarakban, mélytengeri üledékekben és fekete füstölőkben fordul elő nagyobb koncentrációban. Mobilizálódása a szulfid tartalmú ásványok hidrolízisének és kimosódásának a következménye de a szulfát redukáló baktériumok anyagcseréje folytán is termelődhet (42). Amint az oxigén kifogy az üledékekből az aerob, heterotróf baktériumok anyagcseréje útján, az alternatív elektron akceptorok használata – nitrit, nitrát, vas-oxidok, szén-dioxid, szulfát – kerülnek előtérbe a maradék szerves anyag lebontásához. Mivel a tengerek üledékében a szulfátok fordulnak elő a legnagyobb koncentrációban (20-30 mM), ezért itt a szulfát redukció az uralkodó anaerob anyagcsere forma (42). Biotikus úton tehát a tengerekben keletkezik a legnagyobb mennyiségű hidrogén-szulfid, ami mivel erősen reaktív, könnyen alkot fémekkel – elsősorban vassal – fekete csapadékot (43). A fémekkel való reakcióképességében rejlik toxikus hatása is, ami a hidrogén–cianid vagy szén–monoxid hatásához hasonló. A hidrogén–szulfid felvételére specifikus transzport rendszer nem ismert, de mivel a hidrogén–szulfid kis méretű és nagy diffúziós képességű lipofil molekula, a nitrogén–monoxidhoz és szén–monoxidhoz hasonlóan könnyen diffundál a sejtmembránokon át (44). A sejtekben a hidrogén–szulfid a hem-csoportokat tartalmazó enzimek vasatomjaihoz kapcsolódva leállítja a sejtlegzést, többek közt a citokróm c-t gátolva (45). Az oxidatív foszforilációt gátló hatása mellett reaktív gyököket is

képez. Cianobaktériumokban pedig kimutatták, hogy a hidrogén–szulfid gátolja a PSII fotokémiai rendszert (46). Számos faj különböző adaptációs mechanizmusokkal és fiziológiai válaszokkal reagál a környezetben előforduló eltérő koncentrációjú szulfid jelenlétére (47).

A hidrogén–szulfid egy energia–gazdag vegyület. A hidrogén–szulfid szulfáttá való oxidálásának eredményeként $716 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ energia, míg tioszulfáttá való további oxidálásának eredményeként $936 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ energia szabadul fel (42). Ezt az energia potenciált számos anaerob környezetben élő foto- és kemoautotróf mikroorganizmus használja fel: elektron donorként fotoszintézisben és légzésben játszik szerepet. Ezen kívül magasabbrendű szervezetekben különböző egyéb fiziológiai funkciókat tölt be a hidrogén–szulfid (48). Az egyik legjelentősebb ilyen funkciója emlősökben, a nitrogén–monoxidhoz és szén–monoxidhoz hasonlóan, az idegrendszer működésének szabályozásához szükséges jelátviteli folyamatokban betöltött szerepe (44,49).

2.2.2. A szulfid–kinon oxidoreduktázok az élővilágban

A cianobaktériumok és a növények fotoszintézisének eredményeként kialakult jelenlegi erősen oxidatív atmoszféra ellenére mindmáig fennmaradtak sajátos körülmények között működő anaerob anyagcsere folyamatok. Ezek a metabolikus utak lényegében olyan korai földtörténeti korok maradványai, amelyekben a Föld óceánjai oxigénmentesek és szulfiddal telítettek voltak (1,2,50) és fennmaradtak olyan élőlényekben, amelyek folyamatosan vagy átmenetileg szulfiddal vagy egyéb redukált vegyülettel telített anaerob életterekben éltek/élnek.

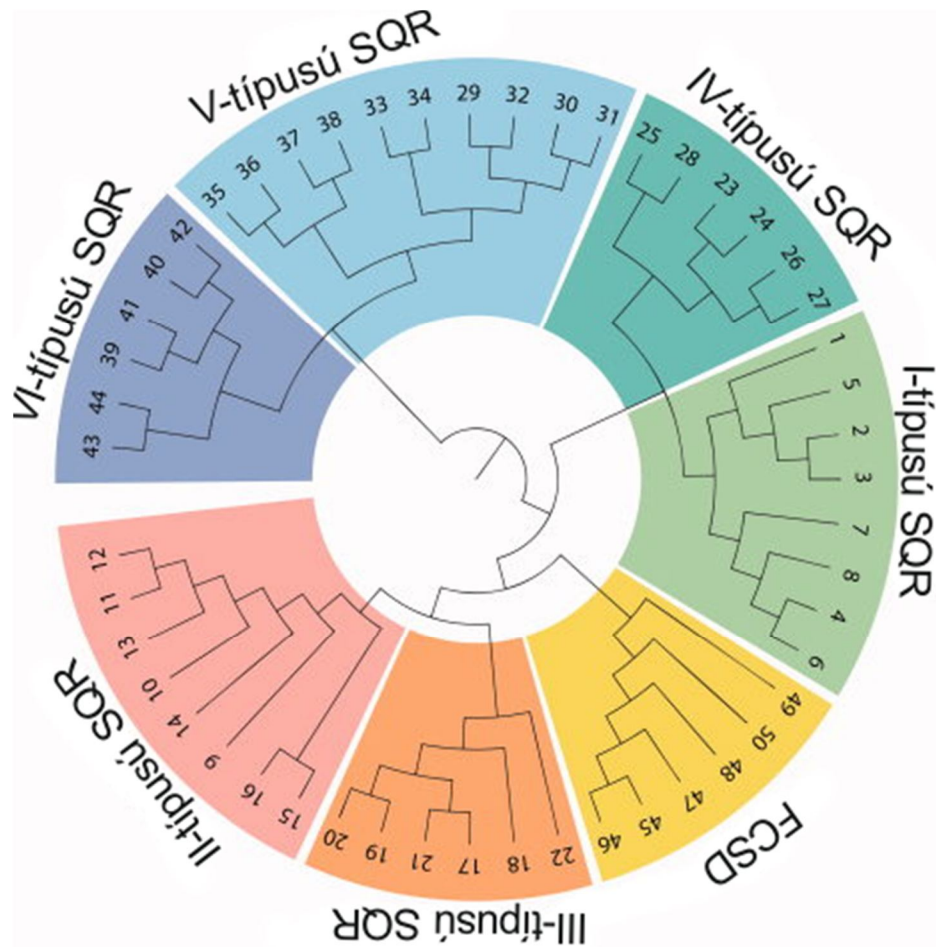
Számos organizmus él magas szulfid tartalmú környezetben, ezekben pedig olyan enzimek alakultak ki, amelyek által csökkenteni tudják a szulfid toxikus hatását, vagy pedig

elektron donorként fotoszintézisben vagy légzésben hasznosíthatják. A diszulfid oxidoreduktázok családjába tartoznak ilyen enzimek, melyek közül a legismertebbek a flavocitokróm c és a szulfid–kinon oxidoreduktáz (10).

Szulfid–kinon oxidoreduktázokkal homológ gének az egész élővilágban fellelhetők. A hajtásos növényeket kivéve valamennyi élőlénycsoportban megtalálhatóak (10). Funkcionális SQR enzimek jelenlétét elsősorban prokariótákból mutatták ki: archeákban (pl. *Acidianus ambivalens*) (51), acidofil (*Acidithiobacillus ferrooxidans*) (52), termofil (*Aquifex aeolicus*) (53), bíbor kén– (*Chromatium vinosum*) (35), bíbor nem–kén (*Rhodobacter capsulatus*) (37), zöld kén– (*Chlorobium limicola*) (38), talajbaktériumokban (*Pseudomonas putida*) (54) és cianobaktériumokban (*Oscillatoria limnetica*, *Aphanothece halophytica*) (12). Szulfid–kinon reduktázokat kódoló géneket számos eukariótában is azonosítottak és funkcionális enzimeket is tanulmányoztak néhány képviselőjükben. Például élesztő gombákban (*Schizosaccharomyces pombe*) (55), puhatestűekben (56), férgekben (*Arenicola marina*) (57), *Urechis uncinatus* (58)) és az emberi szervezetben is (48) fellelhetőek működő SQR enzimek. Ez a széleskörű elterjedtség azzal magyarázható, hogy a korai földtörténeti – ún. “vas–szulfid” – világban (59,60) számos prokarióta anyagcseréje függött redukált kénvegyületektől mint energiaforrástól. Ezek közé a prokarióták közé tartoznak az α -proteobaktériumok is (pl. *Rhodobacter capsulatus*) (61), melyeket az endoszimbiózis elmélet szerint a mitokondriumok őseinek tartanak számon és szintén rendelkezhetnek SQR enzimekkel. Az eukarióta sejtek SQR enzimeit tehát a mitokondriumok genomjában kódolták és feltételezhetően az evolúció során szelekciós előnyt biztosítva megőrződtek (2).

A szulfid–kinon oxidoreduktázok eredeti szerepe a fotoszintetikus elektrontranszportban, a víz bontásával analóg módon történő, hidrogén–szulfid bontásából származó elektronoknak a PSI fotokémiai rendszerre való juttatása volt kinon molekulák

közvetítésével. A különböző élőlényekben azonban más szerepet is betölthetnek; így egyeseknél légzésben (53,62), kemolitotrófiában (52), detoxifikációban (58), nehézfém rezisztenciában (55) vagy akár jelátviteli folyamatokban is szerepet játszhatnak (49). Változatos szerepük és funkciójuk eltérő szerkezetük következménye, aminek a rendszerezésére különböző osztályozási kritériumokat dolgoztak ki. Theissen és munkatársai a szulfid–kinon oxidoreduktázokat három alaptípusba csoportosították (2). Majd Pham és munkatársai 5 féle csoportot és egy besorolatlan osztályt állítottak fel (63). Jelenleg azonban a Marcia és munkatársai által kidolgozott rendszerezés a legelfogadottabb, ami figyelembe veszi a fehérjeszekvenciák mellett az újabban megjelent kristályszerkezeteket is (64). Ez utóbbi szerint az SQR–ek 6 osztályba sorolhatóak, munkánkban pedig mi is ezt az osztályozási rendszert vettük alapul. Ebben a csoportosításban a cianobaktériumok SQR-ei az I. osztályba vannak sorolva, egyéb α - és β -proteobaktériumok SQR–ei együtt (2. ábra). Szerkezetük és működésük tanulmányozására többféle prokarióta SQR kristályszerkezete és biokémiai jellemzése is rendelkezésre áll. Az *Aquifex aeolicus* termofil baktérium (65), az *Acidithiobacillus ferrooxidans* acidofil baktérium SQR (66) kristályszerkezete, valamint az *Oscillatoria limnetica* SQR biokémiai és fiziológiai jellemzése és a *Rhodobacter capsulatus* irányított mutagenézis vizsgálatai alapján ez az SQR osztály a legjellemzettebb.

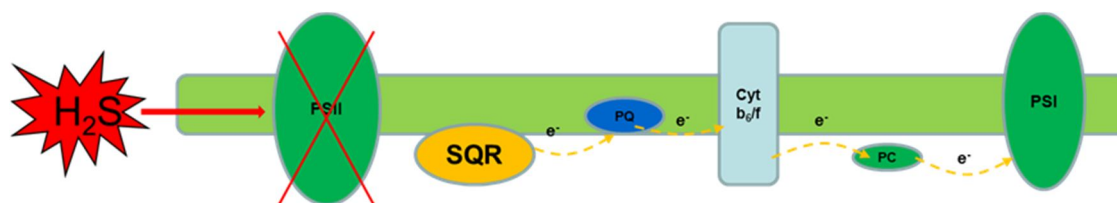


2. Ábra: Szulfid–kinon oxidoreduktázok osztályozása. Az I.-típusú SQR-ek közé tartoznak általában a cianobaktériumok SQR-ei. Ide tartoznak az *A. ferrooxidans*, *A. aeolicus*, *R. capsulatus* az *O. limnetica* és *Aphanothece halophytica* SQR-ei. A II.-típusú SQR-ek közé tartoznak egyes baktériumok de a legtöbb eukarióta SQR-e is: így a *Saccharomyces pombe* élesztő, *Arenicola marina* féreg, *D. melanogaster* ecetmuslica és a humán SQR is. A III.-típusú enzimeket egyes zöld kénbaktériumok (*Chlorobium tepidum* CT1025), *Sulfolobales* archeák és a *Caldivirga maquilingensis* archea (67) SQR-ei képviselik. A IV.-típusúakhoz az *Allochrochromatium vinosum* bíbor kénbaktérium és a *Chlorobium tepidum* CT0117 zöld kénbaktérium SQR-ei tartoznak. Az V.-típus képviselői főleg az archeák közül kerülnek ki, mint pl. az *Acidianus ambivalens* SQR-e. A VI.-típusba pedig a *Chlorobium tepidum* CT1087 és az *A. aeolicus* Aq_788 tartozik. Az FCSD csoportba pedig az *Allochrochromatium vinosum* flavocitokróm c–szulfid–dehidrogenázai tartoznak, melyek az SQR-ekhez hasonló szerkezetűek. (Az ábra módosítva Marcia és munkatársai (64) nyomán).

2.2.3. Cianobakteriumok hidrogén–szulfid alapú alternatív fotoszintézise

Bár a cianobaktériumok víz alapú, PSII–PSI–típusú fotoszintetikus rendszerrel rendelkeznek, egyeseknél kimutatták, hogy szulfid jelenlétében képesek áttérni egy SQR alapú „bakteriális” fotoszintézisre, amiben a vízzel analóg módon a redukált kén szolgáltatja az elektronokat a PSI irányába. Ezt a folyamatot először az *Oscillatoria limnetica* cianobaktériumnál mutatták ki 1975-ben Cohen és munkatársai (68). Az izraeli Solar-tó szulfid–gazdag rétegeiből izolált cianobaktérium aerob, DCMU–érzékeny PSII–PSI alapú fotoszintézist mutatott. Azonban már igen kis koncentrációjú (100–200 μM) szulfid jelenlétében a PSII működése és a CO_2 asszimiláció is leáll a sejtekben. Viszont további 2 óra inkubáció során fény és magas koncentrációjú (2–3 mM) szulfid jelenlétében visszaáll a fotoszintézis, ez viszont DCMU-ra nem érzékeny (3. ábra). Annak ellenére, hogy a sejt átáll egy szulfid alapú anoxigenikus CO_2 asszimilációra, a sejtek osztódása és a 2 napos kétszereződési ideje megegyezik az aerob fotoszintézis útján tapasztalttal (69). Ennek az anoxigenikus fotoszintézisnek az eredményeként extracelluláris kén globulusok jelennek meg a tápközegben (70). A kétórás inkubációs idő után fellépő alternatív fotoszintézisre váltás képessége egy periplazmában lokalizált (46) enzim szintézisét feltételezi, amit kloramfenikol hozzáadásával gátolni is tudtak (69). Arieli és munkatársai azonosították és tisztították a szulfid-kinon oxido-redukcióra képes enzimet (E.C.1.8.5.) az *O. limnetica*-ból (71). Bronstein és munkatársai az *O. limnetica* SQR enzime mellett az *Aphanothece halophytica* SQR enzimét is klónozták, *E. coliban* túltermelték, tisztították és jellemezték genetikai és biokémiai szempontból egyaránt (12). SQR enzimeket kódoló gének azonban a fent említett 2 cianobaktérium fajon kívül jóval elterjedtebbek. A Cyanobase adatbázis szerint jelenleg 39 cianobakterium törzsnek ismert a teljes genomszekvenciája, ezek közül pedig 8 fajban

található az SQR enzimekkel homológ fehérje. Azonban funkcionálisan mindössze néhány ilyen enzimet jellemeztek és csak feltételezhető, hogy valamennyi működőképes és különböző szerepet tölthetnek be, pl. fotoszintézisben, légzésben vagy detoxifikációban. Garlick és munkatársai kimutatták, hogy az általuk tanulmányozott 21 cianobaktérium törzsből 11 képes volt szulfid alapú alternatív fotoszintézisre (72).



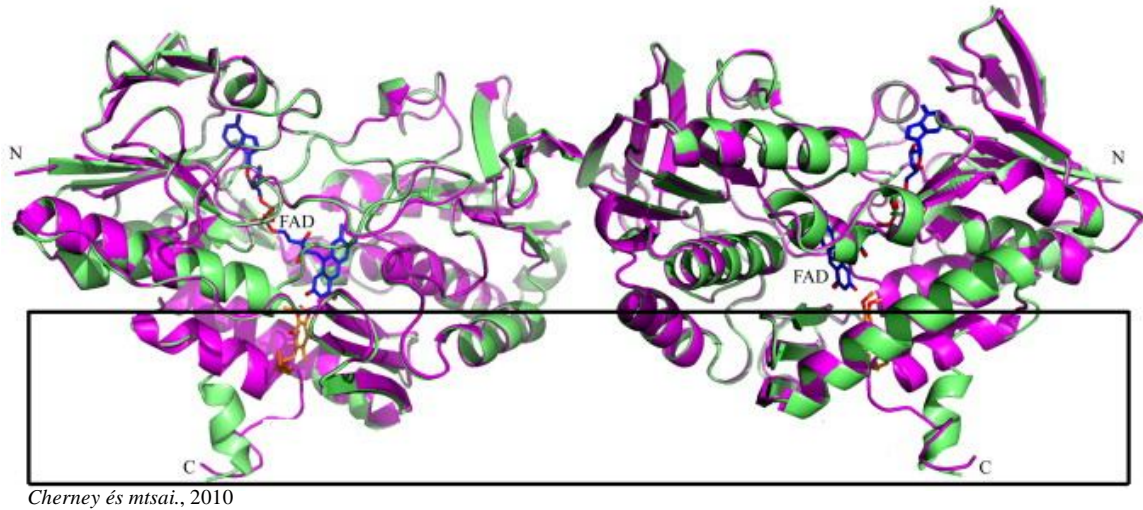
3. Ábra. Az *Oscillatoria limnetica* cianobaktérium alternatív, SQR-alapú fotoszintetikus elektrontranszportjának sematikus ábrázolása. Hidrogén-szulfid jelenlétében a PSII gátlódik de a szerepét helyettesíti az SQR enzim, ami víz helyett a hidrogén-szulfid hasításával szolgáltatja az elektronokat a PSI irányába.

2.2.4. Cianobaktériumok szulfid-kinon oxidoreduktázainak morfológiai, szerkezeti és biokémiai jellemzése

A cianobaktériumok SQR enzimei tehát az I.-típusú SQR-ek általános jellemzőit mutatja. Az *O. limnetica* és *A. halophytica* tisztított és funkcionális enzimei nagyjából 50-60 kDa méretű monomerek, amelyek plasztokinon redukáló aktivitást mutattak (12). Bár a monomerek is funkcionálisak (12), feltételezhető, hogy cianobaktériumokban *in vivo* homodimerekké rendeződnek mint az *Acidithiobacillus ferrooxidans* esetében is (66) (4. ábra), de ismeretesek homotrimerekké rendeződött SQR enzimek is az *A. aeolicus*ban (65) (5., 6.

ábra). A fakultatív di- vagy trimerizációjuk annak tulajdonítható, hogy a különböző membránokban az aktív fehérje funkcionális orientációját hívatottak így fenntartani. Ugyanis az apoenzim kedvezőtlen helyzete maga után vonná a FAD kofaktor és a kinon akceptor molekulák holoenzimben való destabilizálódását (66). Az SQR-ek monotopikus membrán enzimek, nincsenek transzmembrán szerkezeti elemeik (73), periplazmatikus elhelyezkedésük erősen a tilakoid membránokhoz vannak kötődve. Bár a legtöbb I-es típusú SQR decilubikinon-kötő hellyel rendelkezik (61,65,66), cianobaktériumokban az elektron akceptor a plasztokinon (11,12) az enzim aktív helyét képező aminosavak pedig ennek megfelelően módosultak. Cianobaktériumok esetében az SQR plasztokinon redukáló hatását kimutatták *in vivo* teljes sejtes rendszerekben (*A. halophytica*), és *in vitro* izolált tilakoidokban (11) és tisztított fehérjékben is (12).

Az SQR-ek szerkezetében különböző régiókat lehet elkülöníteni, amelyek eltérő szerepeket töltenek be. A membránhoz való illeszkedés disztális részén egy 20-25 aminosavból álló szerkezeti elem, ún. „capping loop” (64) található, amely azért felelős, hogy kizárólag a hidrogén-szulfid juthasson az enzim aktív centrumába. Ezt a régiót az *A. aeolicus* SQR-e esetében a V₂₉₄-K₃₁₂ aminosavak határolják (65). Ezzel összhangban Griesbeck és *mtsai*. helyspecifikus mutagenézissel megállapították, hogy az *R. capsulatus*-ban az *A. aeolicus* V₂₉₄-el homológ valin aminosava (V₃₀₀) felelős az enzim szulfid iránti affinitásáért (61), a K₃₁₂ lizinnek pedig H₂S-FAD oxido-redukcióban van fontos szerepe (51). Az enzim aktív centrumában 3 konzervált cisztein biztosítja az enzim kofaktorának, egy FAD molekulának a koordinálását (10,51,64-66).



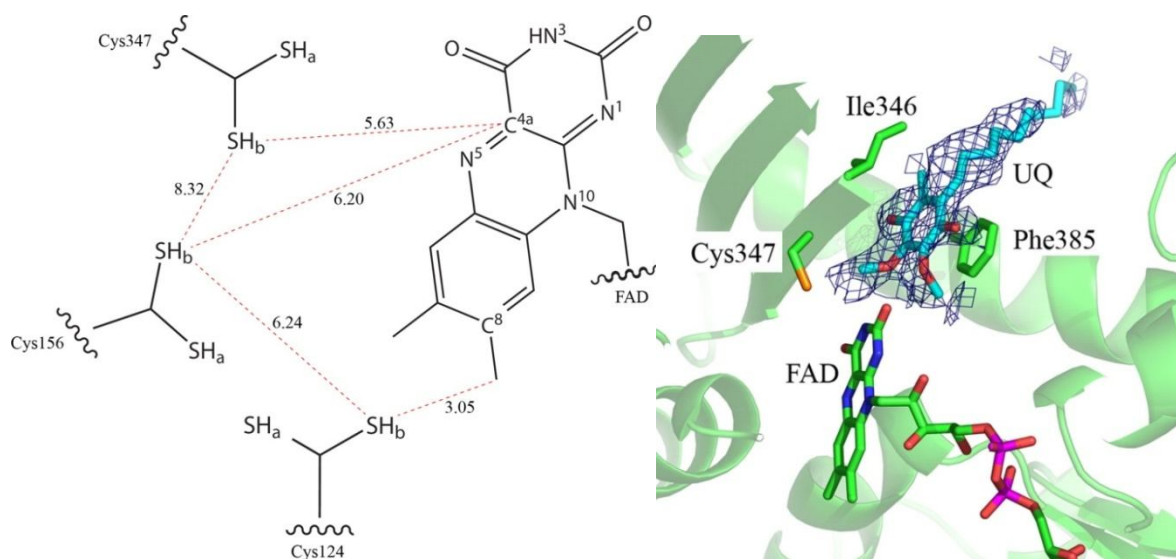
4. Ábra. Az *Acidithiobacillus ferrooxidans* SQR–dimerjének kristályszerkezete. Az enzim aktív centrumában helyezkedik el az enzim kofaktora egy FAD molekula (kézzel jelölve) a kinon molekula „fölött” (narancssárgával jelölve). Az enzim a C–terminális végén illeszkedik a membránba 20 Å mélységbe (a membránt a téglalap jelképezi).

Az *Oscillatoria limnetica*-nál a három konzervált cisztein aminosav a C₁₂₇, C₁₅₉ és C₃₄₅. Ezek az aminosavak katalizálják a szulfid–FAD oxido–redukcióját és a poli–szulfur–gyűrű létrehozását, majd pedig az enzimről történő leválását (51,66). Közvetlenül 2 cisztein aminosav szükséges az SQR működéséhez. Griesbeck és munkatársai irányított pontmutációval kicserélték a C₁₅₉ és C₃₅₃ ciszteineket (ezek az *O. limnetica* C₁₅₉ és C₃₄₅ homológjai) szerin aminosavakra, ami az enzim teljes aktivitás–vesztéséhez vezetett az *R. capsulatus*ban (61). A C₁₂₇S mutáció nem eredményezett enzimaktivitás csökkenést az *R. capsulatus*ban (61), valószínűleg a FAD stabilizálásában és a végső kén termék leválásában játszik szerepet (51,66). Marcia (64,65), Shahak (10) és Brito (51) kimutatták továbbá, hogy

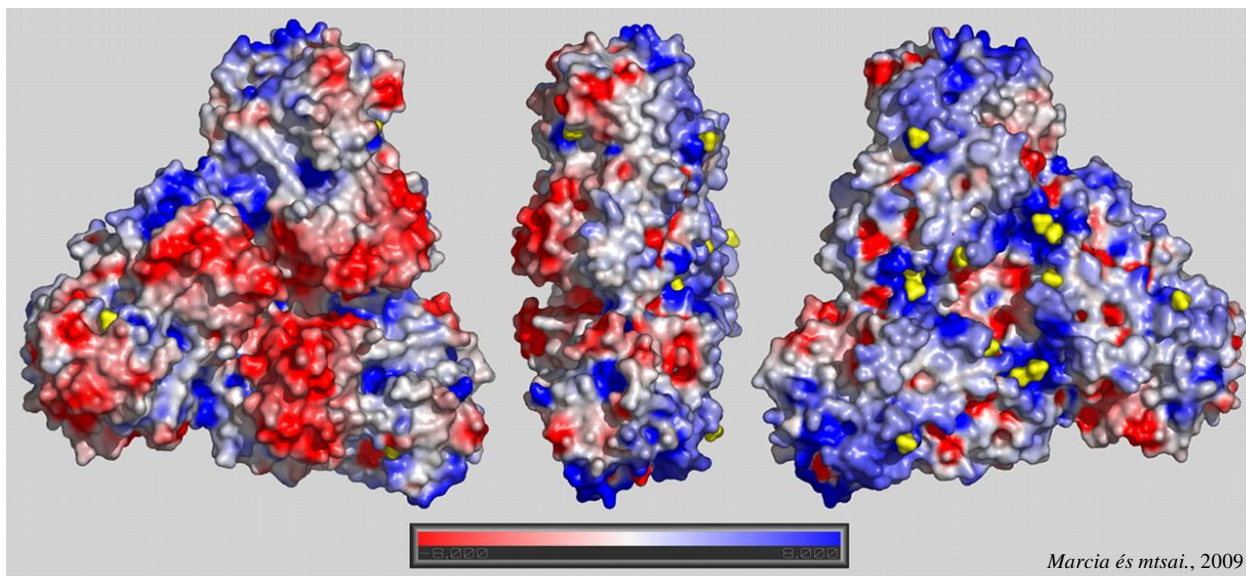
az *A. aeolicus* Y₁₆₁ és E₁₆₂ valamint az *A. ambivalens* K₃₀₄ aminosavai szintén fontos szerepet töltenek be a SQR-ek működésében.

A redukált FAD molekuláról az elektronok továbbítását a kinon molekulára további konzervált aminosavak biztosítják: a kinon molekula aromás gyűrűjét az I₃₄₆ és F₃₈₅ izoleucin és fenilalanin aminosavak stabilizálják az *A. aeolicus*-ban és feltehetőleg a E₃₁₈ és K₃₈₂ glutaminsav és lizin maradékok katalizálják a FAD–kinon közötti oxidoredukciós folyamatokat (65) (5. ábra).

Elektrosztatikai szempontból bizonyos fokú polarizáció figyelhető meg a SQR enzimek felszíni töltését illetően (65,66). A membránnal érintkező felületen több pozitív töltésű aminosav (Arg, Lis, His) figyelhető meg (66), míg az ellentétes oldalon inkább a negatív aminosavak dominálnak. Ugyanakkor, a pozitív töltésű oldal több hidrofób aminosavat tartalmaz, ugyanis itt ágyazódik az SQR enzim a membrán negatív töltésű foszfolipid rétegébe kb. 12-20 Å mélységig (65). Végül pedig, ezen a lipofil felületen figyelhetők meg olyan struktúrák (66), amelyek feltehetően a hidrofób kinonok membránból való felvételéért felelősek (6. ábra).



5. Ábra. Az *Aquifex aeolicus* SQR enzimének aktív centruma. Az I₃₄₆, F₃₈₅ koordinálják a kinon molekulát, míg a C₃₄₇ a közvetlen közelben levő FAD kofaktor oxidációját katalizálja.



6. Ábra. Az *Aquifex aeolicus* SQR enzime. Az enzim felszíne elektrosztatikai szempontból polarizációt mutat. A negatív töltések pirossal, a pozitív töltések pedig kékkel vannak jelölve. Az enzim a pozitív töltésű felszínével illeszkedik a membránhoz.

2.2.5. Az SQR gének szabályzása

Annak ellenére, hogy az SQR enzimeket igen részletesen tanulmányozták, nagyon kevés információ áll rendelkezésre ezek szabályozására vonatkozóan. Irodalmi adatokból nem ismeretesek olyan regulátor fehérjék, amelyek az enzimek expresszióját szabályoznák. Szulfidban gazdag helyeken élő baktériumok esetében kimutatták a gén konstitutív kifejeződését pl. *Chromatium vinosum* bíbor kénbaktériumban (35), az *R. capsulatus* bíbor nem-kén baktériumban (36), vagy a *C. tepidum* zöld kénbaktériumban (38) sőt, hidrogén-szulfid mentes helyen élő termofil *A. aeolicusban* is (64). Indukálható szabályozó mechanizmust feltételeztek a *C. tepidum* egyik SQR génjénél (CT1087-es gén) (74) és az *R. capsulatusban*, de eddig regulátor fehérjét még nem azonosítottak (7,10). Cianobaktériumokra nem jellemző, hogy magas koncentrációjú szulfidot tartalmazó környezetben éljenek, de ismeretes, hogy ilyen körülmények közt néhány faj, mint pl. az *O. limnetica* (11) áttér egy szulfid alapú fotoszintézisre, tehát a gén kifejeződéséért feltehetően valamilyen indukálható regulátor gén a felelős.

2.2.6. A *Synechocystis* 6803 szulfid–kinon oxidoreduktázok

A *Synechocystis* azon kevés élőlények közé tartozik, amelyek genomjában két különböző SQR-t kódoló gén van. Bár a *Chlorobium tepidum* zöld kénbaktérium is rendelkezik több SQR génnel (74), a *Synechocystisben* a két SQR két különböző osztályba tartozik. Az slr0876 a kromoszómán helyezkedik el és fehérjeszekvencia homológia alapján a II.-típusú SQR-ek közé sorolható (2,63), amelyek a mitokondriumok őseinek tartott α -proteobaktériumoktól származhattak (2). Ez magyarázatot ad arra, hogy miért mutat nagyobb

fokú hasonlóságot a *Schizosaccharomyces pombe*, *Anopheles*, *Drosophila*, *Caenorhabditis* vagy humán mitokondriális SQR-ekkel mint a cianobakteriálisakkal (2).

A másik SQR gén a pSYSM plazmidon helyezkedik el és az I.-típusú SQR-ekkel mutat nagyfokú hasonlóságot (10,64). Mivel ez utóbbi jellemző a cianobaktériumokra, munkánk során arra kívántunk fényt deríteni, hogy vajon képes-e a *Synechocystis* a SuoS révén egy szulfid bontáson alapuló alternatív fotoszintézisre.

2.3. Az arzén biológiai vonatkozásai

2.3.1. Arzén a természetben

Az arzén egy félfém, a periódusos rendszer 33. eleme a foszfor, a kén, a szelén – biogén elemek – és antimon közvetlen szomszédságában helyezkedik el, a nitrogén csoport tagja. A földkéregben 0,0005%-os koncentrációjával a 20. leggyakoribb elem (40). Bár elemi állapotban nagyon ritkán fordul elő, számos ásványban megtalálható, főleg kénnel, vassal, rézzel, ólommal és arannyal alkot vegyületeket. Gyakoriak a kénnel képezett vegyületei, ezek közül a realgárt (AsS) és az auripigmentet (As_2S_3) érdemes megemlíteni, de gazdasági szempontból fontos az arzenopirit is (FeAsS). A Föld kialakulásának korai fázisában ezek a vegyületek főleg a magban és a köpenyben halmozódhattak fel (40). A földfelszínre vulkáni aktivitások, mélytengeri hőforrások valamint antropogén úton kerülnek nagy mennyiségben (75). Az arzén a környezettől függően különböző szerves és szervetlen vegyületeket alkothat. A szervetlen vegyületekben eltérő oxidációs állapotban fordulhat elő, mint arzenát – As(V) –, arzenit – As(III) –, elemi arzén – As(0) – és arzenid – As(-III) – (76). Az arzén leggyakoribb formája aerob, vízi környezetben az arzenát, míg az arzenit főleg anaerob környezetben fordul elő (77). A foszforéhoz hasonló elektronegativitása és vegyértékelektron konfigurációja miatt könnyen alakít ki más elemekkel kovalens kötést. Ebből ered toxikus hatása is.

2.3.2. Az arzén toxicitásának mechanizmusa

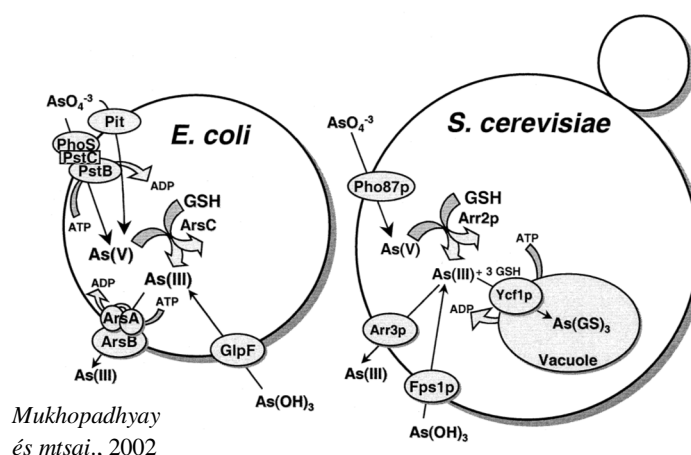
Az arzén toxicitása a különböző vegyületeitől és oxidációs állapotaitól függ. A toxicitás a következő sorrend szerint csökken: arzin > arzenit > arzénoxid > arzenát > arzoniumvegyületek > arzén (78). Mivel az arzenát vegyértékelektron konfigurációja hasonló a foszfátéhoz, a sejtbe jutva helyettesítheti a foszfort a biomolekulákban, instabil és működésképtelen enzimeket és egyéb vegyületeket eredményezve. Megakadályozhatja a sejtlégzésben az oxidatív foszforilációt az ADP–vel való reakció miatt, de a glikolízist, a pentoz–foszfát utat és jelátviteli folyamatokat is gátolhat (77,78). Az arzenit erős affinitást mutat fehérjék szulfhidril csoportjai iránt és hatással van a ciszteinek redox állapotára, ami pedig befolyásolhatja különböző enzimek, receptorok és transzkripció faktorok szerkezetét és működését. Könnyen reagál a glutationnal, glutaredoxinnal és tioredoxinnal és oxidálhatja a redukált glutationt, ami pedig a sejtek egyik fő antioxidánsa. Ez a reaktív oxigén formák felhalmozódásához vezethet, amelyek a fehérjéket, lipideket és a DNS–t károsíthatják (79). Általánosságban megállapítható, hogy a két arzén forma közül a prokarioták az As(V)–el szemben hozzávetőlegesen 10–szer rezisztensebbek mint az As(III)–al szemben (78).

2.3.3. Az arzén felvétele és szállítása a sejtekben

Az eddigi ismeretek szerint nem léteznek az arzén specifikus felvételére szolgáló transzporter rendszerek. Azonban a sejtek nemspecifikus szállító rendszereken keresztül mégis felveszik az arzént. Mivel az arzenát és foszfát gyök között a sejt nem tud különbséget tenni (80), az arzenátot a sejtek foszfát transzport rendszereken keresztül veszi fel (81,82) (7. ábra). Kétféle foszfát transzport rendszer ismeretes a prokariotáknál: egy konstitutív kifejeződésű Pit

(foszfát inorganikus transzport) és egy indukciós Pst (foszfát specifikus transzport rendszer). Az As(V) felvétele leginkább a nemspecifikus Pit rendszer útján történik (75,78). Ennek alapján feltételezhetjük, hogy mivel a *Synechocystis*-ben eddig nem azonosítottak Pit rendszereket, a sejt az arzenátot a Pst1 és Pst2 rendszerein keresztül veszi fel (83). Mivel azonban a Pst1 affinitása közelebb az *E. coli* Pit rendszerének foszfát affinitásához (84) feltehetően az arzenát is inkább a Pst1-en át kerül a sejtekbe. Sanchez-Riego és munkatársai azonban kimutatták, hogy As(III) vagy As(V) jelenlétében a *pst1* és *pst2* gének represszálódnak, feltehetőleg azért, hogy ne jusson további toxikus anyag a sejtbe (85).

Az arzenit a prokariótáknál (86) és sok eukariótánál (87) aquagliceroporinokon keresztül jut a sejtekbe. Ez azért lehetséges, mert 9,3-nál alacsonyabb pH-n az As(III) semleges As(OH)_3 vegyületet képez, ami szerkezetileg a glicerinnel hasonlít. Ezeken a csatornafehérjéken a víz, a glicerinnel és egyéb semleges töltésű kis molekulák szállíthatók (75,78) (7. ábra). Eddigi feltételezések szerint a *Synechocystis*-ben is az *aqpZ* (slr2057) aquagliceroporinon át jut az arzenit a sejtbe, aminek az expressziója viszont gátlódik arzen jelenlétében (85).



7. Ábra. Arzenit és arzenát felvétele az *E. coli*-ban és a *S. cerevisiae*-ben. Az arzenát a Pit és Pst rendszereken keresztül jut a sejtbe, az arzenit pedig a GlpF és Fps típusú aquagliceroporinokon keresztül.

2.3.4. Arzén rezisztencia mechanizmusok

Az arzén a legtöbb élőlény számára toxikus hatású, azonban számos rezisztencia mechanizmus ismert a mikroorganizmusokban a kedvezőtlen hatás elkerülésére (76-78,88-90). E rendszereket általában *ars* operonok génjei kódolják; előfordulhatnak kromoszómán és plazmidokon egyaránt és néha akár többféle rendszer is fellelhető egy organizmuson belül (90). A legáltalánosabb esetben három *ars* gén által kódolt fehérje az ArsR, ArsB és ArsC vesz részt ezekben a detoxifikációs folyamatokban. Számos esetben további két gén terméke az ArsD és ArsA is kiegészítik a rendszert (*arsRDABC* operon). Az ArsB egy As(III) exporter fehérje, amelynek a szerepe az arzenitnek sejtből való eltávolítása aktív transzport révén; ennek működését esetenként az ArsA ATP-áz segítheti (88,90). Érdekes módon nincsen az As(V) exportjára specifikus transzport rendszer. Ahhoz, hogy a sejt megszabaduljon az arzenáttól egy arzenát-reduktáznak (ArsC) (89) redukálnia kell az As(V)-t As(III)-á. Ennek eredményeként a sejt egy kevésbé toxikus arzénformából egy toxikusabbat állít elő, amit viszont exportálni tud. Feltételezhetően ez a mechanizmus azért alakult így ki, mert a korai földtörténeti korokban az arzénvegyületek legnagyobb részben redukált formában voltak jelen, csak a cianobaktériumok megjelenésével és az O₂ feldúsulásával kezdtek el oxidált arzénvegyületek geokémiai úton kialakulni. Ennek megfelelően az elsődleges arzén transzporter rendszerek a redukált arzénre voltak specifikusak, majd pedig az oxidált, más tulajdonsággal rendelkező arzenát megjelenésével feltehetőleg egyszerűbb volt egy arzenát redukáló rendszernek kialakulnia, mintsem egy másik, arzenát-specifikus transzport mechanizmusnak (75,78,88).

Az ArsR szerepe az *ars* operonok repressziós szabályozása (91-94). Az ArsR monomer 13 kDa méretű és szerkezetükben három ciszteinnek (C₃₂, C₃₄, C₃₇) van meghatározó szerepe

az arzén megkötésében (88). Az ArsR fehérjék homodimerek formájában aktívak; As(III) hiányában két alegység kapcsolódik az operon promoter régiójához meggátolva a transzkripciót, As(III) jelenlétében azonban a homodimer konformációt változtat és disszociál a DNS-ről. Az eddigi kutatásokból az is kiderült, hogy az ArsR represszorok az As(III) mellett az antimon – Sb(III) – iránt is affinitást mutatnak (94). Bár a legtöbb esetben az *arsR* gén az *ars* operon közvetlen közelében helyezkedik el, ismert néhány transz helyzetű regulátor gén is (95).

Az ArsD-ről korábban azt feltételezték, hogy szintén génregulációban van szerepe (96,97) de később kimutatták, hogy lényegében egy arzénit-kötő kelátor fehérje, amely a citoszolikus As(III)-at szállítja az ArsAB export rendszerhez (98-100).

2.3.4.1. A *Synechocystis* arzén rezisztencia rendszere

Cianobaktériumok arzén rezisztencia rendszerei kevésbé ismertek, de a *Synechocystis*ben azonosítottak *ars*-típusú géneket (85,101). Ez az *arsBHC* operon a kromoszómán helyezkedik el és egy transz helyzetű *arsR* gén terméke szabályozza a kifejeződésüket (8. ábra). A gének arzénre és antimonra egyaránt expreszálódnak.



8. Ábra. A *Synechocystis* kromoszómán lokalizált *arsBHC* arzén rezisztenciát kodoló operonja. Az *arsB* gén egy arzénit transzportert, az *arsH* gén egy NADPH-függő kinon redukáz, az *arsC* gén pedig egy arzénát-redukáz kódot.

Az *arsB* gén egy integrális membránfehérje, ami az As(III)-t szállítja ki a citoszolból méregtelenítés céljából. Az ArsH egy NADPH-függő kinon reduktáz, aminek az arzenit által okozott oxidatív stresszhatás elleni védekezésben van szerepe (102), az ArsC pedig egy arzenát-reduktáz, ami az As(III)-t As(V)-é alakítja. A *Synechocystis*ben két másik arzenát-reduktáz-gént is azonosítottak: az *arsI1* és *arsI2*-t (85,103,104).

2.3.5. Arzén alapú anyagcserefolyamatok

Az arzén toxikussága ellenére, a szulfidhoz hasonlóan, részt vehet mikroorganizmusok anyagcserefolyamatainak fenntartásában (8). A külső környezettől (oxidáló vagy redukáló, aerob vagy anaerob) és a belső miliótól (milyen redoxpotenciálú kinonok és más redox molekulák állnak rendelkezésre) függően az arzén szolgálhat elektron donorként vagy elektron akceptorként. Az arzenitet egyes baktériumok kemolitotrófia (105-109), heterotrófia (76) vagy fotoszintézis (3) során arzenit-oxidáz enzim segítségével hasznosítják kizárólagos elektron donorként. Más baktériumok pedig légzési folyamatokban terminális elektron akceptorként használják az arzenátot arzenát-reduktáz enzimek révén (110,111). Olyan ökológiai környezetről is beszámoltak, amelyben megfigyelték az arzén biogén ciklusát: egyes mikrobák a vízréteg felsőbb, aerob rétegeiben oxidálták az As(III)-at, míg az anaerob üledékekben élő baktériumok redukálták az As(V)-t (112,113). Az egyik ilyen anaerob, extrém sótűrő baktérium a növekedéshez arzenátot használt terminális elektron akceptorként és szulfidot elektron donorként (113).

Ami a belső környezetet illeti, van Lis és munkatársai (8) rámutattak arra, hogy mivel az As(III)/As(V) redox pár +60 mV redoxpotenciállal rendelkezik, az arzén elektron akceptorként működhet arzenát-reduktáz által közvetített respirációs folyamatokban azon

mikroorganizmusok esetén, amelyek ennél negatívabb redoxpotenciállal jellemzett kinon molekulákat (menakinon és rhodokinon -70 mV) használnak elektrontranszport folyamataikhoz. Azokban a baktériumokban pedig, amelyek pozitívabb redoxpotenciállal rendelkező kinon molekulákat tartalmaznak (ubikinon, plasztokinon, kaldariellakinon, és *Sulfolobus*-kinon $+100$ mV körül), az arzén főleg elektron donorként szerepelhet és arzenit-oxidáz enzimeket működtethet fotoszintetikus vagy kemolitoautotróf anyagcsere útján (8).

3. Célkitűzések

A *Synechocystis* 6803 cianobaktérium genomjában egy olyan operon (*suoRSCT*) található, ami jellemzően anaerob, szulfid és/vagy arzén alapú anyagcsereutakat kódoló géneket tartalmaz. Ez a megfigyelés különösen érdekes abból a szempontból, hogy a *Synechocystis* „növényi típusú” fotofoszforiláció útján állítja elő az életfolyamataihoz szükséges ATP-t, tehát normális körülmények között nem támaszkodik az evolúciós szempontból ősi, bakteriális típusú anyagcsereutakra. Munkánkban arra kerestük a választ, hogy ezek az anaerob anyagcserefolyamatokat kódoló gének aktívak-e a cianobaktériumban, ha igen, akkor, milyen szerepet töltenek be, hogyan szabályozódnak, és milyen evolúciós oka lehetett a gének fennmaradásának.

Részletes célkitűzéseink a következők voltak:

1. Mivel a *suoRSCT* operon feltehetőleg bakteriális típusú anaerob anyagcserefolyamatokat kódol, meg akartuk tudni, hogy a gének megőrizték-e aktivitásukat, kifejeződnek-e és ha igen, milyen környezeti tényezők függvényében expresszálódnak.
2. Mivel a *suoS* gén feltehetően egy szulfid–kinon oxidoreduktáz enzimet kódol, ki akartuk deríteni, hogy az enzim működőképes-e valamint, hogy segítségével áttérhet-e a *Synechocystis* egy alternatív fotoszintézisre szulfid jelenlétében.
3. Annak ellenére, hogy számos organizmus SQR enzime biokémiai, fiziológiai és szerkezeti szempontból részletesen tanulmányozott, jelenleg nem ismert, hogy milyen módon szabályozódik ezeknek az enzimeknek a kifejeződése. Tisztázni

kívántuk, hogy milyen úton szabályozódik a *suoS* gén (és egyúttal a *suoRSCT* operon) a cianobaktériumban.

4. Az operon első génjének (*suoR*) terméke nagyfokú homológiát mutat az ArsR fehérjecsalád regulátoraival, amelyek baktériumok arzén–rezisztencia génjeinek a kifejeződését szabályozzák. Utána akartunk járni annak, hogy ez a gén felelős-e az operon szabályozásáért és hogy milyen összefüggés állhat fenn az arzén represszor és a SQR enzim között.
5. Mivel a *Synechocystis* kromoszómája tartalmaz egy *arsBHC* gének által kódolt arzén rezisztencia rendszert, amit egy transz helyzetű *arsR* gén terméke szabályoz, meg akartuk vizsgálni, hogy van-e kölcsönhatás a *suoRSCT* és az *arsBHC* operonok szabályozása között?
6. A *suoT* gén kromát transzportert kódoló génként szerepel a Cyanobase adatbázisban, de feltételeztük, hogy nagyobb a valószínűsége annak, hogy arzén rezisztenciában vagy –anyagcserében játszik szerepet. Meg akartuk határozni, hogy milyen összefüggés lehet *suo* operon és a kromát– és/vagy arzénvegyületek között és, hogy milyen funkciót tölthet be a SuoT fehérje arzénnal kapcsolatban.
7. Mivel a *suoRSCT* operon feltételezett szerepe eltér a cianobaktériumokra általánosan jellemző anyagcserefolyamatoktól, tisztázni kívántuk azt, hogy milyen eredete és szelekciós előnye lehetett az operonnak az evolúció során.

4. Anyagok és módszerek

4.1. A *Synechocystis sp.* PCC6803 nevelési és kísérleti körülményei

A *Synechocystis sp.* PCC6803 cianobaktérium vad típusú vonalát fotoautotróf módon, 30°C-on tenyésztettük BG-11 tápoldatban (114) folyamatos rázatás (120 rpm), 40 μE folyamatos megvilágítás és 5%-os CO_2 ellátás mellett. A különböző mutáns vonalakat hasonló körülmények között neveltük, de az inaktivált gének szelekciós nyomásának fenntartása érdekében különböző antibiotikumokat adagoltunk a táptalajhoz. A $\Delta\text{suoRSCT}$, ΔsuoR , ΔsuoT és ΔarsB mutáns vonalakat 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ kanamicin–szulfát (Sigma) jelenlétében neveltük.

4.2. Anaerob kísérleti körülmények

Normál, aerob körülmények közt nevelt *Synechocystis* tenyészeteket exponenciális növekedési szakaszban ($\text{OD}_{720}=0.6$) 100 ml-es anaerob tenyészedényekbe helyeztük át, légmentesen lezártuk, majd 10 percig nitrogén gázzal átfújattuk, hogy mentesítsük a légteret és a tápoldatot az oxigéntől. A tenyészethez 8,3 mM NaHCO_3 -ot és 5 μM DCMU-t adtunk; az utóbbit azért, hogy a kettes fotokémiai rendszer gátlásával megakadályozzuk az oxigén képződését, valamint a PSII felőli plasztokinon redukció lehetőségét.

4.3. Klónozási eljárások és a *Synechocystis* mutánsok létrehozása

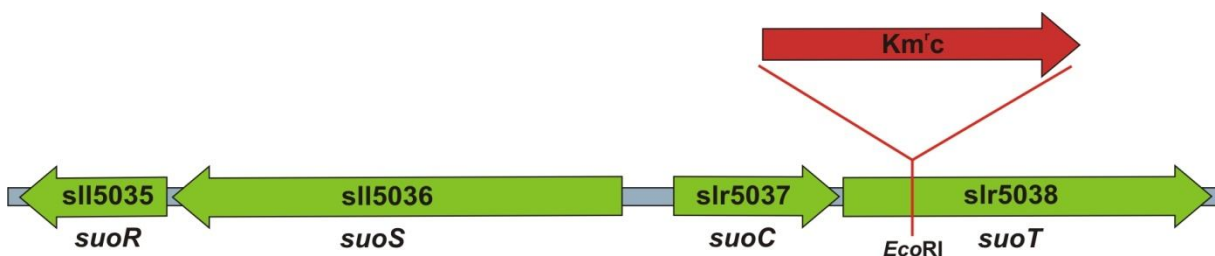
Különböző mutáns vonalakat hoztunk létre a *suoRSCT* gének szerepének a tisztázása érdekében. Az *in silico* klónozási lépéseket, valamint a PCR reakciókhoz felhasznált primerek tervezését a Vector NTI programmal végeztük. Minden plazmid konstrukciót a pBluescript II SK+ vektorból származtattunk. Továbbá minden restrikciós endonukleázt és T4 ligázt a Fermentas (újabbban Thermo Fischer Scientific)-től szereztük be.

4.3.1. A Δ *suoT* mutáns vonal elkészítése

A *suoT* fenotípusának vizsgálatához a gént megszakítottuk egy kanamicin rezisztenciát biztosító kazettával. A következő plazmid konstrukciót készítettük el a Δ *suoT* inszerciós mutáns létrehozásához: az 5038Reg2SalIFw és 5038Reg2NotRev primer párokkal felszorzoztuk a 3832 bp hosszú *suoRSCT* régiót, amely tartalmazta az sll5035 (*suoR*), sll5036 (*suoS*), slr5037 (*suoC*) és slr5038 (*suoT*) géneket. Templátként a *Synechocystis* genomi DNS-ét használtunk, amelyet az alábbiak szerint tisztítottunk: OD₇₂₀=0,6-0,8 közötti sejtsűrűségű szuszpenziót centrifugáltuk, majd pedig 1/20-ad térfogat vízben reszuszpendáltuk, -80 °C-on fagyasztottuk, majd pedig 65 °C-ra melegítettük. Kiolvadás után STET (0.1 M NaCl, 5% triton X-100, 50 mM Tris pH 8.0, 50 mM EDTA) puffer oldatban reszuszpendáltuk a centrifugált sejteket. Ezt egymás utáni 2 alkalommal történő -80 °C-on való fagyasztás, majd pedig 65 °C-os hőkezelés követte. Üveggyöngyök és Tris-EDTA pufferrel telített fenol:kloroform (1:1 térfogatarány, pH=8.0) jelenlétében vortexelve roncsoltuk a sejteket majd további STET puffert adtunk hozzá. A centrifugálással elválasztott felülúszóhoz azonos térfogatú kloroformot adtunk, majd az újbóli centrifugálás után maradt

felülűszöt RN-ázzal (Thermo Scientific) kezeltük. Az oldatot előbb fenol:kloroformmal, majd ismét kloroformmal kezeltük az RN-áz inaktiválásához. Ezután 1/10 térfogat 3 M NaOAc-al 2½ térfogat etanol jelenlétében csaptuk ki a DNS-t -20°C-on. A centrifugált DNS-csapadékot végül vízben reszuspendáltuk és templátként használtuk a különböző gének amplifikálásához.

A *suoRSCT* régiót beklónoztuk a pBluescript II SK+ plazmidba, majd pedig a *suoT* gén *EcoRI* restrikciós vágóhelyére egy kanamicin rezisztenciát biztosító gént (Km^r) ligáltunk, így hoztuk létre a p-*suoTKm* konstrukciót. A Km^r gén-kazettát a pET-28a (Novagen) expressziós plazmidból amplifikáltuk a $Km/StuI$ -Fw és $Km/StuI$ -Rv primerekkel.

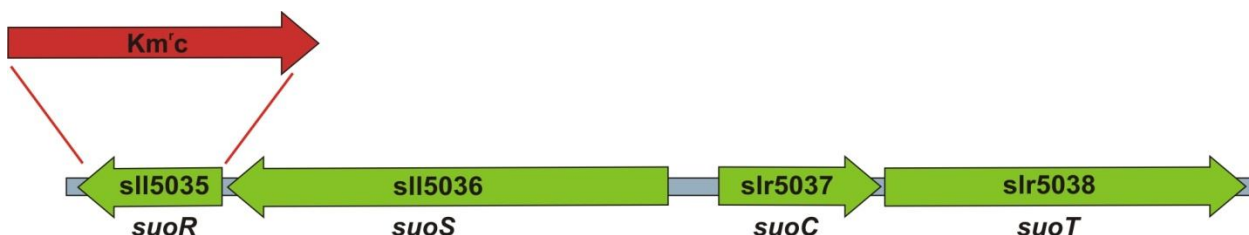


9. Ábra. A *suoT* gén inaktiválása a *Synechocystis*-ben. A Δ *suoT* mutáns létrehozásához a *suoT* génben levő *EcoRI* restrikciós helyre egy kanamicin rezisztenciát biztosító génkzettát klónoztunk, ez által hatástalanítva a gént.

4.3.2. A Δ *suoR* mutáns vonal elkészítése

A Δ *suoR* deléciós mutánshoz a következő konstrukciót készítettük el: PCR-al felszorzoztunk egy *suoR*-“upstream” DNS szakaszt az 5035Sal/EcoF és 5035Sal/EcoR primer párokkal és ezt a pBS plazmidba ligáltuk létrehozva a p-*upsuoR* konstrukciót. Hasonlóan egy *suoR*-“downstream” DNS részt is felszorzoztunk az 5035Pst/NotF és 5035Pst/NotR primer párokkal, amivel létrehoztuk a p-*dwnsuoR* konstrukciót. Egy 1640 bp hosszú Km^r kazettát amplifikáltunk a pET-28a plazmidból a $KmEco/PstF$ és $KmEco/PstR$ primerekkel, majd ezt ligáltuk a p-*upsuoR* plazmidba. Ezt követően kivágtuk az utóbbi

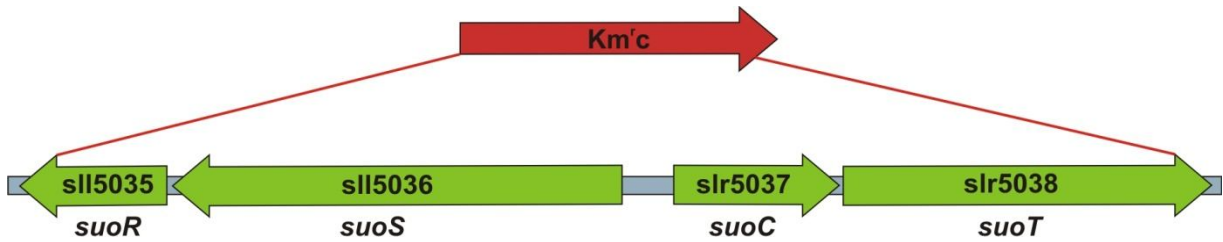
plazmidból a *suoR*-“upstream”+Km^rc részt és ligáltuk a p-dwns*suoR* konstrukcióba, hogy létrehozzuk a végső p-*suoRKm* plazmidot (10. ábra).



10. Ábra. A *suoR* gén semlegesítése. A Δ *suoR* mutáns létrehozásához egy kanamicin rezisztenciát biztosító génre cseréltük homológ rekombináció útján a *suoR* gént.

4.3.3. A Δ *suoRSCT* mutáns vonal elkészítése

Annak érdekében, hogy inaktiváljuk az *suoRSCT* operont, a *Synechocystis* genom DNS-ről egy 708 bp szakaszt sokszoroztunk fel a *suoR* gén “upstream” régiójából a FoUp5035NotI és ReUp5035BamHI primerekkel. Ezt a DNS szakaszt ligáltuk egy 1662 bp Km^rc kazettához, amit szintén a pET-28a plazmidból nyertünk. Ezzel párhuzamosan egy 562 bp-os DNS szakaszt amplifikáltunk a *suoT* gén “downstream” régiójából a suoTdnstrmFv-1 és suoTdnstrmRw-577 primerekkel. Ez utóbbit ligáltuk az előbbi fragmenthez, ami tartalmazta a Km^rc kazettát és létrehoztuk a p-*suoRSCTKm* konstrukciót, amit majd a Δ *suoRSCT* mutáns vonal létrehozásához használtunk fel (11. ábra).



11. Ábra. A *suoRSCT* operon inaktíválása. A Δ *suoRSCT* mutáns létrehozásához egy kanamicin rezisztenciát biztosító génre cseréltük a *suoRSCT* géneket.

4.4. A *Synechocystis* sejtek transzformálása

A p-*suoTKm* konstrukciót elektroporálással (115) juttattuk a sejtekbe, hogy létrehozzuk a Δ *suoT* mutánst (9. ábra); a p-*suoRKm* és p-*suoRSCTKm* konstrukciókat pedig természetes transzformálással (116) juttattuk a sejtekbe, hogy létrehozzuk a Δ *suoR* (10. ábra) és Δ *suoRSCT* (11. ábra) mutánsokat.

A transzformáns sejteket kezdetben $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ kanamicin-szulfátot tartalmazó BG-11 lemezen növesztettük 30°C -on folyamatos megvilágítás mellett. Ezután a rekombináns sejteket tartalmazó kolóniákat $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, majd később pedig $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ kanamicin-szulfátot tartalmazó BG-11 lemezre oltottuk a teljes szegregáció elérése érdekében. Végül a kanamicin rezisztens mintákat $50 \text{ ml } 50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ kanamicin-szulfátot tartalmazó BG-11 tápoldatba oltottuk.

4.5. Génexpresszió mérés

A különböző gének expressziójának a mérésére a relatív mRNS szintek változásának a meghatározásával következtettünk kvantitatív qRT-PCR módszerrel. A sejtek teljes RNS tartalmának kivonásához $20 \text{ ml } \text{OD}_{720}=0,6$ optikai sűrűségű tenyészetből indultunk, majd az

RNS kivonást a “forró fenol” eljárással folytattuk (117). Az RNS mintákból az esetlegesen még jelen lévő genomi DNS-t DN-áz (AMBION) kezeléssel távolítottuk el. Az RNS mintákról reverz transzkripcióval cDNS-t szintetizáltunk. Ehhez H-MuLV (Thermo Scientific) reverz transzkriptáz enzimet használtunk a gyártó útmutatásai alapján. A cDNS mintákat templátként használtuk 2×Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific) és 5 pmol primer tartalmú qPCR reakcióban 20 µL végtérfogatban. Belső kontrol génként a *Synechocystis* P-típusú RN-áz B alegységét kódoló gént (*rnpB*) használtuk. A gének relatív indukcióját/expresszióját a $\Delta\Delta_{CT}$ -módszerrel határoztuk meg. A génexpressziós mérésekhez használt primerek szekvenciái az 1. táblázatban vannak feltüntetve. A *suoS* gén expressziójának a mérésére a suoS-F/suoS-R oligonukleotid primer párt, a *suoT* gén expressziójának a méréséhez pedig a suoT-F1/suoT-R1 oligonukleotid primer párt használtuk.

4.6. A *Synechocystis* nehézfémekkel való kezelése a *suoT* gén expressziójának a méréséhez

20 mL $OD_{720}=0,5$ optikai sűrűségű, exponenciális növekedési fázisban levő *Synechocystis* tenyészeteket különböző fém- és félfémvegyületekkel kezeltünk 15 percig: 12 µM NiCl₂, 3 µM CoCl₂, 5 µM ZnSO₄, 1,5 µM CdCl₂, 500 µM NaAsO₂, 1 mM Na₂HAsO₄, 10 µM CuSO₄, 7 µM Cr₂(SO₄)₃, 7 µM K₂Cr₂O₇, 100 µM C₈H₄K₂O₁₂Sb₂ × X H₂O.

4.7. A hidrogén-szulfid gázkromatográfiás mérése

Aerob módon nevelt $OD_{720}=0,75$ optikai sűrűségű *Synechocystis* tenyészeteket anaerob környezetbe helyeztük (az anaerob kísérleti körülményekben leírtak szerint). A tenyészeteket sötétbe tettük, hogy meggátoljuk a fotoszintézist, majd $0,5 \text{ mM Na}_2\text{S}$ -ot fecskendeztünk a tápoldatba. A tenyészeteket egy órán át preinkubáltuk, hogy a hidrogén–szulfid koncentrációja kiegyenlítődjön a folyadék- és légfázis között, majd megmértük a légtér kezdeti szulfid tartalmát. Ezt követően fényen, $30 \text{ }^\circ\text{C}$ -on és 120 rpm -en rázatva inkubáltuk a tenyészeteket 24 órán keresztül, majd pedig újra megmértük a szulfid koncentrációt a légtérben.

A hővezetőképességi detektorral (TCD) felszerelt Shimadzu GC-2010 gázkromatográfban egy HP-PLOT Q poliszitirén-divinilbenzén (DVB) kapilláris oszlop ($30 \text{ m} \times 0,53 \text{ mm}$ átmérő $\times 40\mu\text{m}$ bevonat, Agilent Technologies) biztosította a gázok szétválasztását. Mozgófázisként N_2 vivőgázt használtunk $7,95 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ áramlási sebességgel. Az injektor és a detektor hőmérséklete $150 \text{ }^\circ\text{C}$ -ra, míg az oszlopé $120 \text{ }^\circ\text{C}$ -ra volt állítva.

4.8. A SuoS fehérje szulfid–kinon oxidoreduktáz aktivitásának spektrofotometriás tanulmányozása

Az anaerob körülmények között nevelt *Synechocystis* tenyészetekhez $2 \text{ mM Na}_2\text{S}$ -ot fecskendeztünk, majd a sejteket 5 órán át inkubáltuk. A tenyészetekből tilakoid kivonatot készítettünk Komenda és Barber (1995) eljárása szerint (116,118).

A szulfid-függő PQ-1 redukció kinetikáját 257 nm -en követtük anaerob körülmények között, N_2 gázzal oxigénmentesített kvarc küvettákban egy Evolution 300 UV-Vis spektrofotométerrel (Thermo Scientific). A reakcióelegy 10 mM K-HEPES-t ($\text{pH } 7,4$), 10 mM

MgCl₂-ot, 10 mM KCl-ot, 40 μM PQ-1-et és 10,5 μg klorofill·mL⁻¹ tartalmú tilakoid kivonatot tartalmazott. A szigorú anaerob környezet megőrzése érdekében 10 U·mL⁻¹ katalázt, 1,0475 U·mL⁻¹ glükóz-oxidázt és 20 mM glükózt mértünk a reakcióelegyhez. A küvetákat ezután légmentesen zártuk, N₂ gázzal anaerobizáltuk majd 125 μM Na₂S-ot fecskendeztünk a reakció indításához. A Na₂S törzsoldatot frissen készítettük anaerob fülkében.

4.9. A *suoR* gén klónozása, expressziója és a SuoR fehérje tisztítása

PCR-al felsokszoroztuk a *suoR* gént *Synechocystis* genomi DNS-ről az sll5035Exp2Fw és sll5035Exp2Rv primerekkel, amelyek 5'-*Bam*HI és 3'-*Hind*III restrikciós hasítási helyeket biztosítottak a génszakasz végein. A *suoR* gént pET-28a expressziós vektorba klónoztuk, ami N- és C-terminális polihisztidin-tag-el ellátott fúziós fehérjét biztosított Ni-affinitású kromatográfiás tisztításhoz. A SuoR fúziós fehérjét *E. coli* BL21(DE3)RIL expressziós törzsben termeltettük: a transzformált sejteket 22 °C-on, 250 rpm-en 250 ml 34 μg·mL⁻¹ kanamicin-szulfátot tartalmazó LB+ (20 mM glükózt és 2% etanolt tartalmazó LB) tápoldatban tenyésztettük. OD₆₀₀=0.4-0.5 optikai sűrűségnél 0.2 mM IPTG adagolásával indítottuk el a fehérjetermelést 5 órán keresztül. Majd a sejteket centrifugáltuk, és átmostuk 20 ml "tisztító" oldattal (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol, 10% glicerin, pH: 8.0), majd reszuszpendáltuk 9 ml "tisztító" oldatban, ami 5 mg lizozimot, 2 mM PMSF-t, 2 mM β-merkaptóetanolt és 1 ml CelLytic-B 10× (Sigma) oldatot is tartalmazott. A szuszpenziót 15 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten folyamatos rázatás mellett, majd a sejteket szonikáltuk (Branson Sonifier 450), centrifugáltuk, majd a felülúszót elválasztottuk a sejttörmelékektől. A felülúszót Miracloth-on (Calbiochem) szűrtük át, majd hisztidin-

affinitású Ni-töltetű oszlopkromatográfiával tisztítottuk. Ehhez a BioRad Profinity IMAC Ni-oszlopot használtuk a gyártó utasításai szerint.

4.10. Elektroforetikus mobilitás-eltolódás vizsgálata (Electrophoretic mobility shift assays)

Az EMSA lényege, hogy egy specifikus DNS-fehérje kölcsönhatást mutat ki. A potenciális promoter-szakaszt tartalmazó DNS-t reagáltatjuk a tisztított fehérjével, amiről feltételezzük, hogy kölcsönhatásba lép a cél DNS-el, majd elektroforézis útján figyeljük a DNS mobilitását. Ha az illető fehérje affinitást mutat a kérdéses DNS szakasz iránt, akkor komplexet képez vele és az elektroforézis során a mobilitása csökken.

PCR-al felszorzottuk a *suoRSCT* gének feltételezhető promoter régióját tartalmazó 410 bp hosszú DNS szakaszt (továbbá: cél-DNS) az slr5037up-1F és slr5037up-410R primer párokkal. Nem-specifikus, kontrol DNS fragmentumnak a pBS vektorból sokszoroztuk fel M13 univerzális primerekkel egy 280 bp hosszú részt, ami a plazmid többszörös klónozóhely (MCS, multiple cloning site) szakaszát tartalmazta. A reakció 20 μ L végtérfogatban zajlott és 100 mM Tris-HCl-ot (pH: 7.5), 10 mM EDTA-t, 1 M KCl-ot, 1 mM DTT-t, 50% glicerint, 0.1 mg·mL⁻¹ BSA-t, 647 ng cél DNS-t, 338 ng kontrol DNS-t és sorban növekvő mennyiségű (0-70 ng· μ L⁻¹) tisztított Suo-R fehérjét tartalmazott. A reakcióelegyet 30 percig inkubáltuk 30 °C-on, majd egy nem denaturáló 8%-os poliakrilamid gélre vittük Hellman és Fried eljárása szerint (119). Az elektroforézis 4 °C-on és 40 V-on zajlott tris-acetát-EDTA pufferben (pH: 9.5). A gélét etídium-bromiddal festettük. Annak érdekében, hogy bizonyítsuk a SouR represszor arzén-függő disszociációját a *suoRSCT* operonról, a nagyobb koncentrációjú (56

ng· μ L⁻¹) SuoR fehérjét tartalmazó reakcióelegyekhez sorban növekvő (0.5 mM, 25 mM, 250 mM) mennyiségű NaAsO₂-t mértünk.

Annak ellenőrzésére, hogy a SuoR befolyásolja-e a *Synechocystis* kromoszomális arzén-rezisztencia operonjának, az *arsBHC*-nek a szabályozását, felsokszoroztunk egy 256 bp DNS régiót, ami az *arsBHC* gének promoterét tartalmazta. Ebben az EMSA kísérletben pozitív kontrollnak 513,4 ng SuoR-specifikus *suoRSCT*-promoter DNS-t, 510 ng *arsBHC* promoter-DNS-t és sorban növekvő mennyiségű (14, 28, 56 és 112 ng· μ L⁻¹) tisztított SuoR fehérjét használtunk.

4.11. Arzén-rezisztencia mérés

A vad típusú *Synechocystis* és Δ *suoT* mutáns tenyészetek arzén rezisztenciáját növekedési kísérletekkel tanulmányoztuk. Ehhez normál BG-11 tápoldatot használtunk, amihez 1 mM NaAsO₂-t mértünk. A vad típusú és Δ *suoT* vonalak növekedését 8 napon keresztül követtük, mérve a tenyészetek optikai sűrűségét 750 nm hullámhosszon.

4.12. Az intracelluláris arzén tartalom meghatározása induktív csatolású plazma tömegspektrometriával (ICP–MS)

A *Synechocystis* vad típusú, Δ *suoT* és Δ *arsB* mutáns tenyészeinek intracelluláris arzén tartalmának a meghatározásához a NaAsO₂-el való kezelés után a mintákat ICP–MS vizsgálatra küldtük. OD₇₂₀=0,8 sűrűségű sejtenyészetet 10 μ M NaAsO₂-el kezeltünk 14 órán keresztül majd centrifugáltuk, átmostuk BG-11 oldattal, újra centrifugáltuk majd pedig a

sejteket folyékony nitrogénben fagyasztottuk és liofilizáltuk. Átlagban 50 mL tenyészetből 43.97 ± 3.15 mg nedves sejttömeg, ebből pedig liofilizálás után 8.73 ± 0.34 mg száraz tömeget nyertünk. A mintákat ICP vizsgálatra küldtük: tömény salétromsavval és mikrohullámú kezeléssel (MARSXpress CEM, Matthews) roncsolták 200 °C-on 1600 W-al 15 percig, majd pedig az arzén koncentrációt egy Thermo Scientific XSeries II ICP-MS készülékkel határozták meg.

4.13. *In silico* kísérletekhez használt online adatbázisok és szoftverek

A *Synechocystis* gének szekvenciáit a Cyanobase cianobakteriális adatbázisból nyertük (120).

Különböző mikroorganizmusok génszekvenciáinak keresésére és homológia analízisekre az NCBI (National Center for Biotechnology Information) BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (121) adatbázisát vettük igénybe.

Annak érdekében, hogy felderítsük, hogy más mikroorganizmusokban is előfordulnak-e a *Synechocystis suoRSCT* operonjához hasonló szerkezetű és genetikai környezetű régiók a GeCont-I genomi kontextus vizsgáló online bioinformatikai szolgáltatást használtuk (122).

Fehérjék másodlagos szerkezetének a meghatározására a Jpred (123) szolgáltatását használtuk.

Transzmembrán fehérje-szegmenseket elsősorban a SOSUI szoftverrel (124) azonosítottuk, majd a Topcons szolgáltatással ellenőriztük (125).

A SuoS enzim aktív helyét biztosító konzervált aminosavakat a RaptorX (126) kötőhely-felismerő szoftverrel azonosítottuk.

A SuoR és SuoS fehérjék 3D szerkezetének felállításához a Swiss-Model (127) online szolgáltatást, a Protein Data Bank (128) adatbázist és a YASARA 3D (www.yasara.org) modellező programot használtuk.

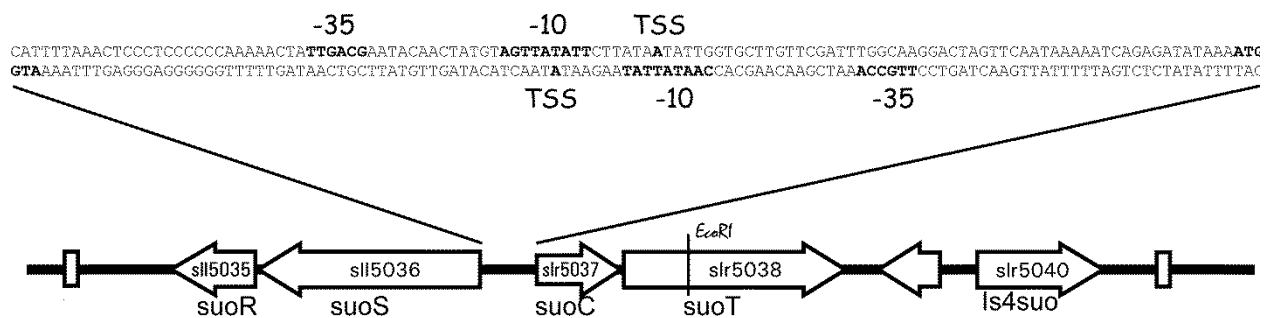
Primerek	Szekvencia (5'-3')
5038Reg2SalIFw	AGGAG <u>TCGACT</u> GGTTAAATTTGCCAAGGCTA
5038Reg2NotRev	ACTT <u>GCGGCCGC</u> CTTACCAATGACTAATAAAGTC
Km/StuI-Fw	TC <u>AGGCCT</u> AACTAAGTAATCATGAACAATAAACTGTCTGCTTAC
Km/StuIRv	TC <u>AGGCCT</u> TAGTTATTAGAAAACTCATCGAGCATC
5035 Sal/EcoF	GTAG <u>TCGACT</u> TGGGGATAGCCATCTTTAAT
5035 Sal/EcoR	CAT <u>GAATT</u> CAAGCATCTGCAAATATTGCG
5035Pst/NotF	AGG <u>CTGCAG</u> GAGACATTTGCTTGACTTAG
5035Pst/NotR	GAAG <u>CGGCCGC</u> AAATTACCTACATTACTCCTGAACC
KmEco/PstF	AGT <u>GAATT</u> CTTACTTAGTTAGGCGTTTTTCCATAGGCTCC
KmEco/PstR	TGG <u>CTGCAG</u> TAAGTAACTAATGCGCGGAACCCCTATTTGT
sll5035Exp2Fw	AAG <u>GATCC</u> ATGCAAATATCTGTGAATAAAACCC
sll5035Exp2Rv	TGGTA <u>AAGCTT</u> TTAGTCTTCGCAGGATGAAA
FoUp5035NotI	AAG <u>CGGCCGC</u> GGGGATAGCCATCTTTAATAAACTGC
ReUp5035BamHI	AAG <u>GATCC</u> TGCGCTCAGTCTTTAATTGA
suoTdnstrmFv-1	TTTT <u>AAGCTT</u> GGCATTGTCTGTCTCGCTATTT
suoTdnstrmRw-577	TTT <u>CTCGAG</u> CCCCTAGTAATAAATAAACTCA
suoCKanamFv-1	TTT <u>GGATCCA</u> AGAACATGTGAGCAAAAAGG
suoCKanamRw-1675	TTTT <u>AAGCTT</u> GCGGAACCCCTATTTGTTA
slr5037up-1F	CGATGTCGACTTAAGGTCTCATGGGTGTAA
slr5037up-410R	TTTATATCTCTGATTTTTATTGAAC
arsBpromot1F	TATCAGAAAAATAGGTTGAATGCC
arsBpromot265R	AAACAAATTGAGCGTTCCCC
suoS-F	TCCTGAACCCTACATTGGCC
suoS-R	TCTGAGCATTGGTTAACGTGG
suoT-F1	TGATCGCCCTGATGGAAGAA
suoT-R1	GAGCCGTATTTACCGGAAAAGA

1. Táblázat. Klónozási és génexpressziós kísérleteinkhez használt primerek szekvenciái. Az aláhúzott szakaszok a resztrikciós enzimek hasítási helyeit jelölik.

5. Eredmények

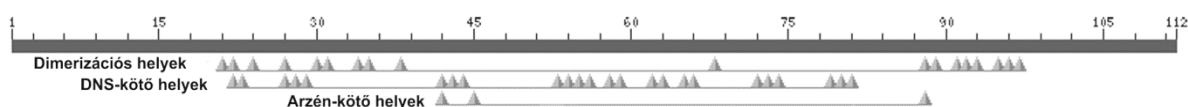
5.1. A *suoRSCT* gének és genetikai környezetének *in silico* tanulmányozása.

Az *sl15035*, *sl15036*, *slr5037* és *slr5038* nyitott leolvasási keretként jelölt gének a *Synechocystis* pSYSM plazmidján helyezkednek el a plazmid 34736-38144 régiójában 3408 bp hosszan. Az *sl15035*-*sl15036* és *slr5037*-*slr5038* tandem gének a nehézfém rezisztenciát biztosító operonok (129) szerkezetéhez hasonlóan ellentétes irányban íródnak át. Ezeknek a génpároknak a -35 és -10 promoter elemei átfednek és valószínűleg egy közös represszor szabályozása alatt állnak (12. ábra).



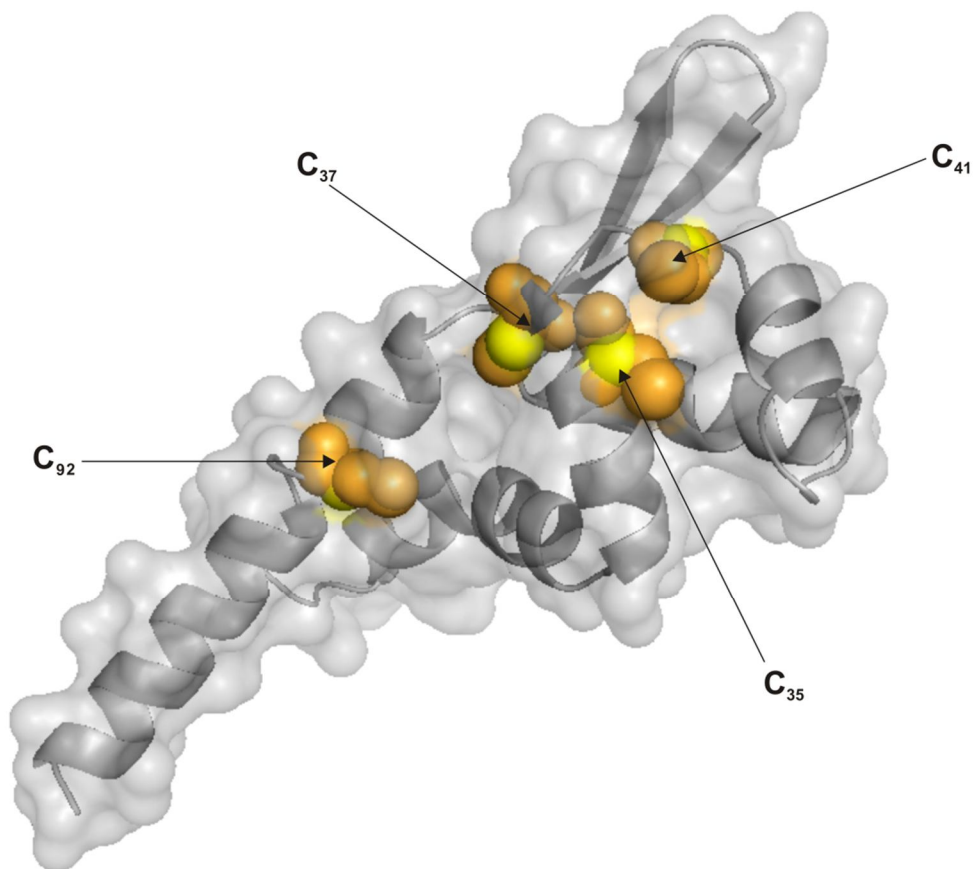
12. Ábra. A *suoRSCT* operon szerkezete. A gének irányát nyilak jelzik. Az ellentétes irányba átíródó *suoSR* és *suoCT* gének promoter régiói közös DNS szakaszon helyezkednek el: a -35 és -10 promoter elemek átfednek, ezek, valamint a transzkripció start (TSS) helyek és a *suoS* és *suoC* start kodonjai vastag betűkkel vannak jelölve.

Az sll5035-ös gén terméke arzén rezisztenciában szerepet játszó regulátor fehérjékkel mutat nagyfokú hasonlóságot és ennek alapján az ArsR fehérjék családjába tartozik egyéb bakteriális transzkripciós represszorokhoz hasonlóan. A fehérje elsődleges szerkezete alapján arra lehet következtetni, hogy egyetlen doménből áll. Különböző konzervált régiók is azonosíthatóak, amelyek egyrészt represszor fehérjékre jellemző dimerizációt biztosítanak, másrészt DNS- és As-kötő helyeket tartalmaznak (13. ábra).



13. Ábra. A SuaR fehérje elsődleges szerkezetének sematikus ábrázolása. Az aminosav szekvencia alapján a SuaR az ArsR fehérjék családjába tartozik, amelyek hélix-fordulat-hélix szerkezetű bakteriális transzkripciós regulátor fehérjéket csoportosítanak. A SuaR konzervált doméneket tartalmaz, amelyek dimerizációs, DNS-kötő és As(III)-kötő helyeket biztosítanak.

Arzén-kötő fehérjék részletes tanulmányozása során (88) három cisztein aminosavat azonosítottak, amelyek feltehetőleg az arzén megkötésében játszhatnak szerepet. A Swiss-model szolgáltatás segítségével felállítottuk a SuaR fehérje háromdimenziós modelljét, hogy megvizsgáljuk, vajon a SuaR fehérje rendelkezik-e azokkal az aminosavakkal, amelyek az arzén megkötéséhez elengedhetetlenek, illetve, hogy ezek térbeli elhelyezkedése optimális-e a feltételezett funkció betöltéséhez. A modell szerint a SuaR a megfelelő konfigurációban tartalmazza azokat a konzervált cisztein aminosavakat (C₃₅, C₃₇, C₄₁, C₉₂), amelyek az arzén megkötésében játszhatnak szerepet (14. ábra).



14. Ábra. A SuaR fehérje 3D modellje. A fehérje 3D szerkezetét a PDB adatbázisban található 3F6O szerkezet alapján alkottuk meg. Az arzén megkötésében szerepet játszó kénatomok sárga gömbökként vannak feltüntetve a narancssárgával jelölt cisztein (C₃₅, C₃₇, C₄₁, C₉₂) molekulákban.

Az sll5036-os gén által kódolt és SuaS-nek elnevezett fehérje aminosav szekvenciája 52% illetve 54% azonosságot és 66% illetve 67% hasonlóságot mutat az *Oscillatoria limnetica* és *Aphanothece halophytica* SQR-eivel. Cianobaktériumok SQR-eivel mutatott nagyfokú hasonlósága alapján feltételeztük, hogy a *suoS* gén is egy aktív enzimet kódol. A fehérje 428 aminosavból áll, becsült molekulatömege 46,794 kDa, 8,7-es pH-n található az izoelektromos pontja, valamint 4,97-es nettó töltéssel rendelkezik semleges pH-án. A fehérjének nincsenek transzmembrán régiói a Sosui predikciós program szerint, ami egybehangzik azzal a kísérleti

megfigyeléssel, hogy a legtöbb SQR monotopikus enzim (73) szorosan a membránhoz kötődve a periplazmatikus oldalon. A cianobaktériumok SQR–ei monomerek formájában aktívak, amint azt az *Oscillatoria limnetica* és *Aphanothece halophytica* cianobaktériumok tisztított SQR–ei esetén megmutatták (12). A monomer formák mellett ismertek homodimerekké rendeződő SQR-ek is pl. az *Acidianus ambivalens* archeában (51) vagy homotrimerekké rendeződő SQR-ek az *Aquifex aeolicus* termofil baktériumban (65).

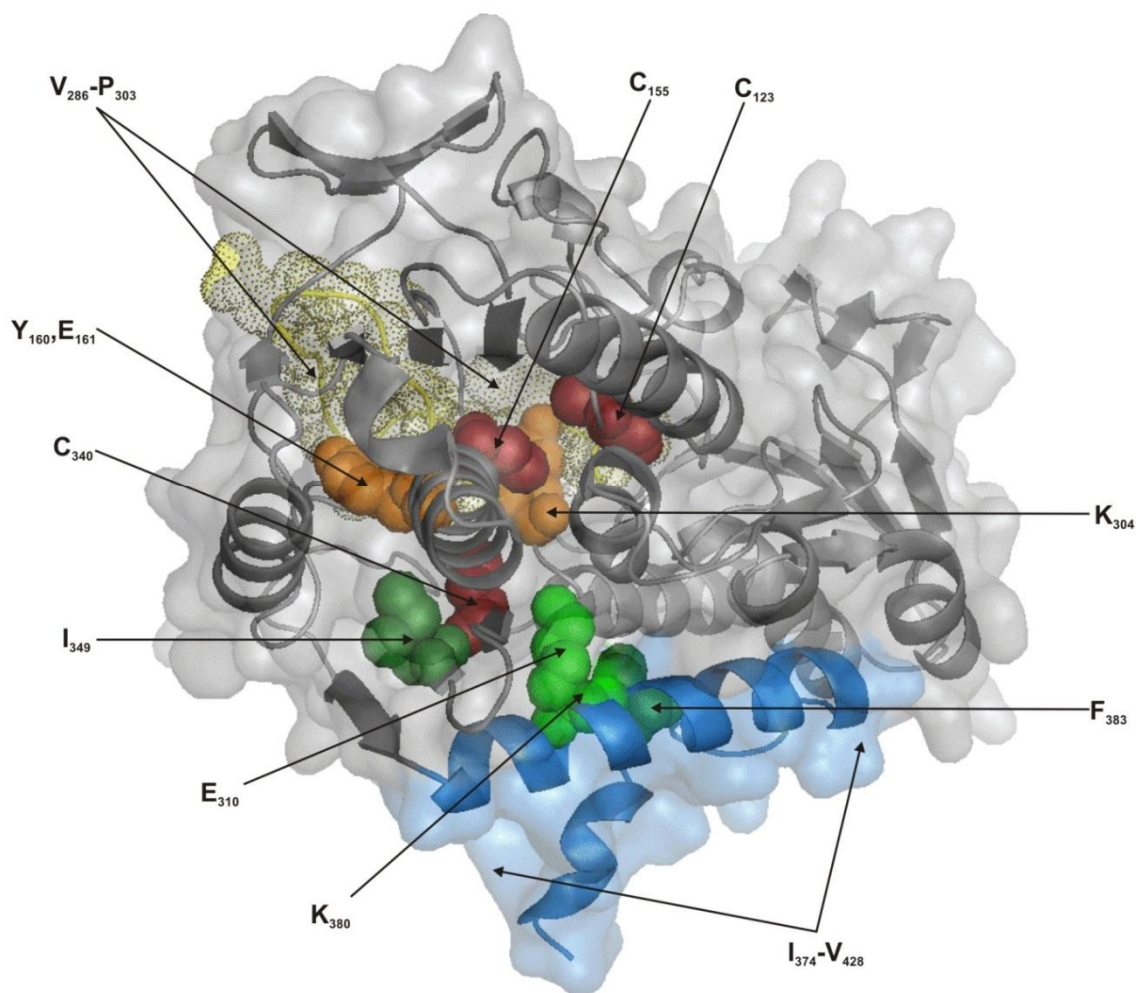
Annak érdekében, hogy kiderítsük a SuoS fehérje funkcióját először a RaptorX fehérje szerkezet– és funkció–predikciós program segítségével megvizsgáltuk az aminosav szekvenciáját, hogy megállapítsuk, rendelkezik-e azokkal a szerkezeti elemekkel, doménekkal amelyek alapján feltételezhető, hogy a SuoS egy aktív SQR (2. táblázat).

Zseb	Gyakoriság	Ligandum	Kötésben részt vevő aminosavak
1	124	<u>FAD</u>	I7 G8 A9 G10 L11 G12 S34 E35 F36 V42 P43 L45 K77 V78 A102 S103 G104 I122 C123 P158 A252 F254 G285 V286 K304 S305 G306 T309
2	98	<u>H2S</u>	C155 F156 G157 P158 P303 K304 S305 C340 F341 A342 Y351
3	35	<u>DCQ</u>	L11 P43 G306 Q307 L339 F341 I352 K380 F383 W399 F400 K402
4	29	<u>H2S</u>	S121 C123 H127 F249

2. Táblázat. A SuoS fehérje konzervált doménei. A táblázatban a „Zseb” mutatja a különböző funkciót betöltő domének számát, a „Gyakoriság”, hogy az adatbázisban hány esetben fordult elő hasonló ligandum-kötő hely. A „Ligandum” jelenti az emzim kofaktorait, szubsztrátjait, míg a jelölt aminosavak az illető ligandum megkötésében játszanak szerepet.

A SuoS fehérje SQR–ekre jellemző aminosavainak az azonosítása után 3D homológia modellezéssel megvizsgáltuk az aktív domének térbeli elhelyezkedését is, hogy lássuk, hogy a teljes molekula szerkezetileg is alkalmas lehet-e az SQR szerepre.

Az eddig más mikroorganizmusokból tisztított SQR-ek kristályszerkezete, valamint funkció- és hely-specifikus mutáció-analízisek alapján felállítottuk a SuoS enzim 3D szerkezetét és működési elvének molekuláris modelljét (15. ábra). A jelenlegi szakirodalom 3 mikroorganizmusból származó SQR kristályszerkezetéről számol be: 2009-ben határozta meg Brito munkatársaival az *Acidianus ambivalens* archea (51), majd Marcia és munkatársai az *Aquifex aeolicus* hipertermofil baktérium (65), majd 2010-ben Cherney és munkatársai az *Acidithiobacillus ferrooxidans* proteobaktérium SQR-ainak kristályszerkezetét (66). Mivel az ismert kristályszerkezetű SQR fehérjék közül az *Acidithiobacillus ferrooxidans* SQR-e mutatja a legnagyobb fokú azonosságot (35%) és hasonlóságot (54%) a SuoS fehérje szekvenciájával, ezért ezt választottuk templátként a 3D-szerkezet modellezéséhez. A YASARA program segítségével megalkottuk a SuoS térbeli szerkezetét és meghatároztuk azokat az aminosavakat, funkciós csoportokat és szerkezeti alegységeket, amelyek lényeges szerepet töltenek be az enzim működésében. A következő aminosavakat és szerkezeti elemeket sikerült azonosítanunk a fehérje szerkezetében (15. ábra):

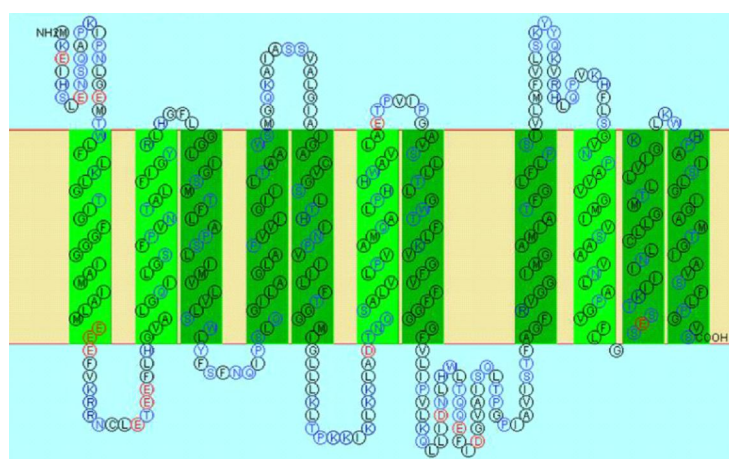


15. Ábra. A *Synechocystis* 6803 SuoS SQR fehérje homológia-modellezéssel felállított térszerkezete. Különböző színekkel vannak feltüntetve a fehérje szerkezeti vagy működési szempontjából fontosabb aminosavai és motívumai: piros gömbökkel vannak jelölve azok a konzervált cisztein aminosavak (C₁₂₃, C₁₅₅, C₃₄₀), amelyek az enzim aktív helyét képezik és a FAD kofaktort koordinálják, valamint a hidrogén-szulfid oxidációját katalizálják. Másodlagos aminosavak, amelyek szintén a hidrogén-szulfid oxidációjában vesznek részt (Y₁₆₀, E₁₆₁, K₃₀₄) narancssárga gömbökként vannak feltüntetve. Sárga pontokkal és szalaggal van jelölve az a V₂₈₆-P₃₀₃ aminosavak által közrezárt régió („capping loop”), amelynek a hidrogén-szulfid felvételében van szerepe. A sötétzöld gömbök azokat az aminosavakat (I₃₄₉, F₃₈₃) jelölik, amelyek a plastokinton stabilizálásában játszanak szerepet, míg a világoszöld aminosavak (E₃₁₀, K₃₈₀) a plastokinton redukálását katalizálják. A kék színnel kiemelt I₃₇₄-V₄₂₈ aminosavak által közrezárt rész egy hidrofób kettős hélixet alkotnak. Az enzim ezen a részen kapcsolódik a membránhoz és itt történik meg a plastokinton membránból történő felvétele is.

A SuoS fehérje vizsgálatának *in silico* eredményei alapot adtak további *in vitro* és *in vivo* kísérletek megtervezésére és az enzim működésének bizonyítására.

A *suoSR* gének közvetlen közelében, ellentétes irányban helyezkedik el az slr5037-es *suoC* gén, ami egy 127 aminosavat tartalmazó fehérjét kódol. A SuoC a mikroorganizmusokban nagymértékben konzervált DUF302-es fehérje családba tartozik, funkciójuk azonban még ismeretlen. Ugyanakkor a SuoC 32%-os azonosságot és 60%-os hasonlóságot ($e=10^{-22}$) mutat az *Agrobacterium tumefaciens* egy feltételezett fehérjéjével (AT5A_19741), ami pedig alacsony hasonlóságot mutat különböző arzenit-oxidázokkal és transzport fehérjékkel.

A *suoC* gén után az slr5038, *suoT* gén következik, ami a Cyanobase annotációja szerint egy kromát transzporterekkel homológ fehérjét kódol. A SuoT a Sosui és Topcons predikciók szerint egy 11 transzmembrán hélixet tartalmazó integrális fehérje (16. ábra). Azonban, mivel a *suoT* egy SQR-t és egy ArsR-típusú fehérjét kódoló gén szomszédságában van, nagyobb valószínűséggel lehet kapcsolatban kén vagy arzén anyagcserével/rezisztenciával mint króm transzporttal.



16. Ábra. A SuoT integrális fehérje 11 transzmembrán α -hélixét ábrázoló feltételezett szerkezete.

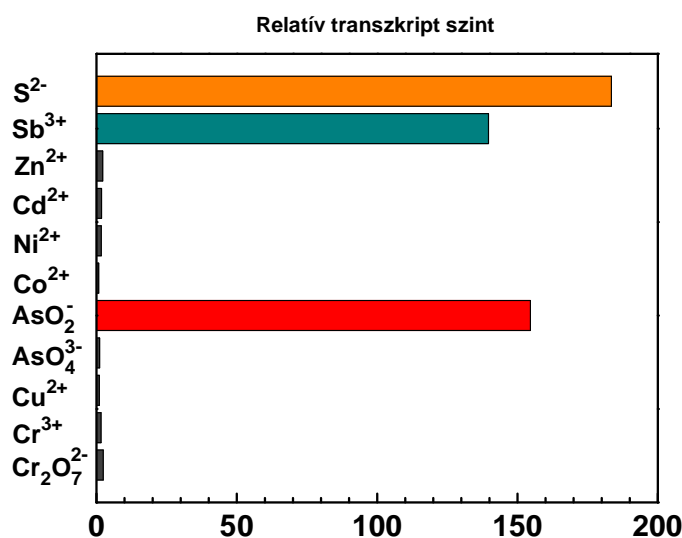
5.2. A SuoS SQR enzim genetikai és fiziológiai jellemzése

Bár SQR enzimeket számos prokariótából és eukariótából is kimutattak, génszabályozásukról annyi ismert, hogy a legtöbb élőlényben feltehetően konstitutívan fejeződnek ki. Ennek tisztázására fogtunk bele génexpressziós mérésekbe, hogy kiderítsük milyen kémiai elemekre, vegyületekre indukálódnak a gének, és hogy hogyan szabályozódik a gének kifejeződése.

5.2.1. A *suoRSCT* operon expressziójának és génszabályozásának a vizsgálata

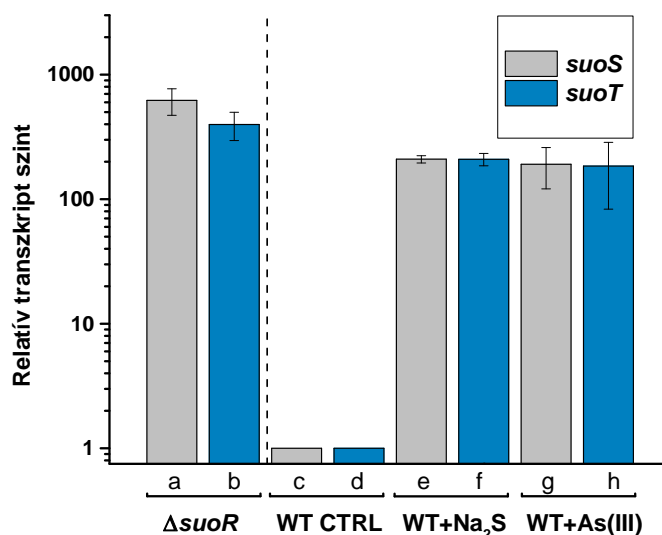
Az *in silico* tanulmányok eredményei szerint a *suoSR* és a *suoCT* gének feltételezhetően egy közös represszor szabályozása alatt átfedő promoter régiókkal rendelkeznek és ellentétes irányban íródnak át. Mivel a *suo* gének különböző anyagcserefolyamatokkal és/vagy rezisztencia mechanizmusokkal hozhatók kapcsolatba (a *suoR* gén valószínűleg arzén rezisztenciában, a *suoS* kénanyagcserében, a *suoT* pedig nehézfémek, mégpedig kromát rezisztenciában/transzportban játszhat szerepet), ezért elsősorban azt vizsgáltuk, hogy a gének milyen, a környezetben is előforduló, vegyi anyagokra expresszálódnak, valamint, hogy hogyan szabályozódik a gének kifejeződése. Különböző nehézfémekkel és kénvegyületekkel kezeltük a vad típusú sejteket és azt találtuk, hogy a vizsgált 11 vegyület közül mindössze 3-ra indukálódnak a *suo* gének: arsenit, szulfid és antimon kezelésnél figyeltünk meg emelkedett génexpressziót. Bár a *suoT* gén kromát transzporterként van nyilvántartva az adatbázisban, nem észleltünk affinitást sem Cr(III) sem Cr(VI) iránt. Továbbá, mivel a SuoR arzén rezisztenciával hozható összefüggésbe, *Synechocystis* tenyészeteket As(III)- illetve As(V)-sókkal kezeltünk és figyeltük a gének expresszióját. Azt figyeltük meg, hogy As(III) jelenlétében expresszálódnak a *suoRSCT*

gének, de normális körülmények között As(V)–re nem (17. ábra). Ez a szelektív affinitás jellemző az ArsR fehérjékre, de ezek mellett az is, hogy ezek a represszorok antimon jelenlétében is megengedik a génkifejeződést (101). Ezért megvizsgáltuk, hogy vajon az ArsR család fehérjéire jellemzően a SuoR is derepresszálódik-e Sb(III) jelenlétében. A qRT–PCR–os kísérleteink eredményei azt mutatták, hogy a *suoT* gén valóban kifejeződik antimonra is, ebből pedig arra következtettünk, hogy az egész operon indukálódik Sb(III)-ra, tehát a SuoR Sb(III)-ra is specifikus.



17. Ábra. A *suoT* gén expressziója különböző ionokkal kezelt vad típusú mintákban. A *suoT* gén nem mutat expressziót sem különböző krómvegyületek jelenlétében, sem pedig egyéb nehézfémekre. A *suoT* – és egyúttal a *suoRSCT* operon – csak arzenit, antimon és szulfid jelenlétében mutat expressziót. Az ábrán a relatív transzkript szint a *suoT* mRNS-nek a kezelt mintákban meghatározott, a kezeltlenre vonatkoztatott mennyiségét jelenti, és így az indukció mértékét mutatja.

Mivel a *suoRSCT* operon első génje a *suoR* termékének a SuoR-nek az aminosav szekvenciája alapján az ArsR represszorok családjába tartozik, feltételeztük, hogy szerepe a *suo* operon szabályozásában áll. Hogy ezt kiderítsük, a *Synechocystis*nek egy Δ *suoR* mutáns vonalát hoztuk létre, amiben a *suoR* gént egy kanamicin rezisztencia génre cseréltük ki. Megmértük a gének expressziós szintjét a Δ *suoR* mutánsban és azt tapasztaltuk, hogy a *suoR* hiányában a *suoS* és *suoT* gének konstitutívan kifejeződnek, tehát az egész operon a SuoR repressziója alatt áll a vad típusban (18. ábra, a és b oszlop).



18. Ábra. A *suoS* és *suoT* gének expressziója a Δ *suoR* mutánsban és a vad típusban szulfid és arzenit jelenlétében. A *Synechocystis* Δ *suoR* mutánsban a *suoS* és *suoT* gének konstitutívan fejeződnek ki, tehát a SuoR fehérje egy represszor szerepét tölti be; hiányában a gének derepresszálódnak és maximálisan kifejeződnek (a, b oszlopok). A *Synechocystis* vad típusú tenyészeiben a gének repressziós gátlás alatt vannak (c, d oszlopok) de szulfid (e, f oszlopok) és/vagy arzenit - As(III) - (g, h oszlopok) jelenlétében a gének kb. 200-szoros expressziót mutatnak. Az ábrán a relatív transzkript szint a *suoS* és *suoT* mRNS-eknek a vad típusú sejtek kezeletlen változatához (c és d oszlopok) viszonyított mennyiségét jelenti.

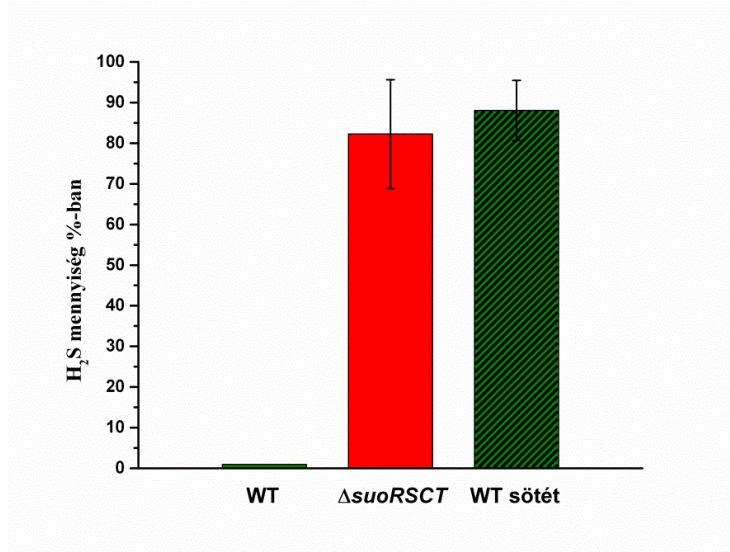
5.2.2. A *SuoS* SQR enzim redox funkciójának a tanulmányozása

Annak érdekében, hogy megállapítsuk, hogy a *Synechocystis* *SuoS* SQR enzime aktív-e, az enzim elektron akceptor félreakcióját és elektron donor félreakcióját specifikus módszerekkel, külön tanulmányoztuk. A szulfid oxidációt (elektron akceptor félreakció) teljes sejtes rendszerben gázkromatográfiával, a kinon redukciót (elektron donor félreakció) pedig tilakoid kivonatban anaerob spektrofotometriával, a plasztokinon redukáltsági fokának mérésével határoztuk meg.

Vad típusú, Δ *suoRSCT* mutáns és sötétben inkubált vad típusú *Synechocystis* tenyészetekben vizsgáltuk a *SuoS* enzim működését. A különböző változatokat egyenként 0,5 mM nátrium-szulfiddal kezeltük és 1 óra inkubálási idő elteltével megmértük a kezdeti szulfid tartalmat. 24 óra elteltével ismét megmértük a tenyészetek szulfid tartalmát.

Azt figyeltük meg, hogy a fényen tartott vad típusú változat tenyészedeényeiben nem volt kimutatható mennyiségű hidrogén-szulfid, tehát a sejtek teljes mértékben elfogyasztották a tenyészethez adott hidrogén-szulfidot, ez pedig jelentős bizonyítéka a *SuoS* enzim elektron akceptor félreakciójának (19. ábra). A Δ *suoRSCT* mutáns esetében hozzávetőlegesen 20%-os hidrogén-szulfid csökkenést tapasztaltunk, tehát a *suoS* gén és -enzim hiányában nem valósul meg a hidrogén-szulfid metabolizmusa. Hasonló eredményt kaptunk a sötétben inkubált vad típusú változatnál is, ahol nagyjából 10%-os hidrogén-szulfid csökkenést észleltünk, tehát a *SuoS* *in vivo* aktivitása a fény jelenlétéhez kötött. Ennek az eredménynek a legkézenfekvőbb magyarázata az, hogy fény jelenlétében a hidrogén-szulfidról származó elektronok kinon akceptorokra továbbítódnak, viszont ez a folyamat sötétben gátlődik a fotoszintetikus elektrontranszport leállása és a PQ-állomány magas redukáltsági foka miatt. Ez bizonyítja, hogy fény jelenlétében a *SuoS* a hidrogén-szulfidból származó elektronokat a fotoszintetikus

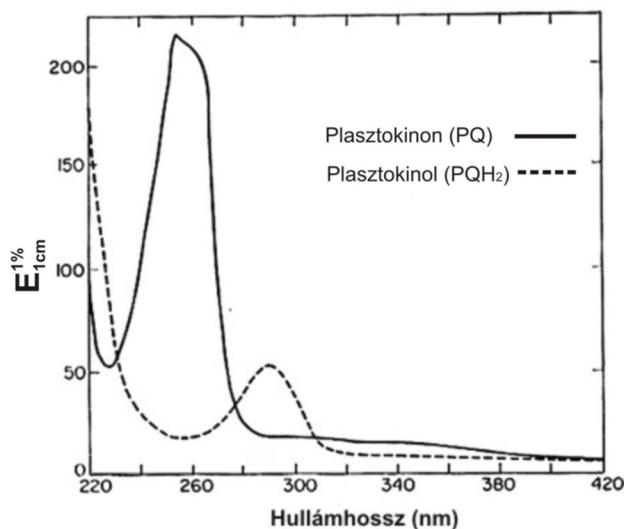
elektrontranszport láncba szállítja, tehát egy alternatív fotoszintetikus útvonal kulcsenzime. Az a tény, hogy a $\Delta suoRSCT$ mutánsban és a sötétben tartott vad típus esetében 10–20%-ban kimutatható a hidrogén-szulfid csökkenés, az feltehetően kémiai reakcióknak tulajdonítható, ugyanis a tápoldatban mikroelemek formájában található fémek könnyen képeznek szulfidokat az amúgy igen reaktív hidrogén-szulfiddal (43).



19. Ábra. Gázkromatográfiával mért hidrogén-szulfid tartalom a *Synechocystis* SuoS enzimének jelenlététől és működésétől függően. Az ábra oszlopai a vad típusú, $\Delta suoRSCT$ mutáns és a sötétben tartott vad típusú *Synechocystis* tenyészetek gázkromatográfiával mért hidrogén-szulfid tartalmát mutatják az eredeti hidrogén-szulfid mennyiség függvényében %-ban kifejezve. 24 óra inkubáció után a vad típusú sejtek 100%-ban lebontják a hidrogén-szulfidot. A $\Delta suoRSCT$ mutáns a SuoS enzim hiányában, valamint a sötétben inkubált vad típusú tenyészetek a fotoszintetikus transzport lánc gátlása miatt nem oxidálják a hidrogén-szulfidot.

5.2.3. A SuoS SQR enzim elektron donor félreakciójának a tanulmányozása

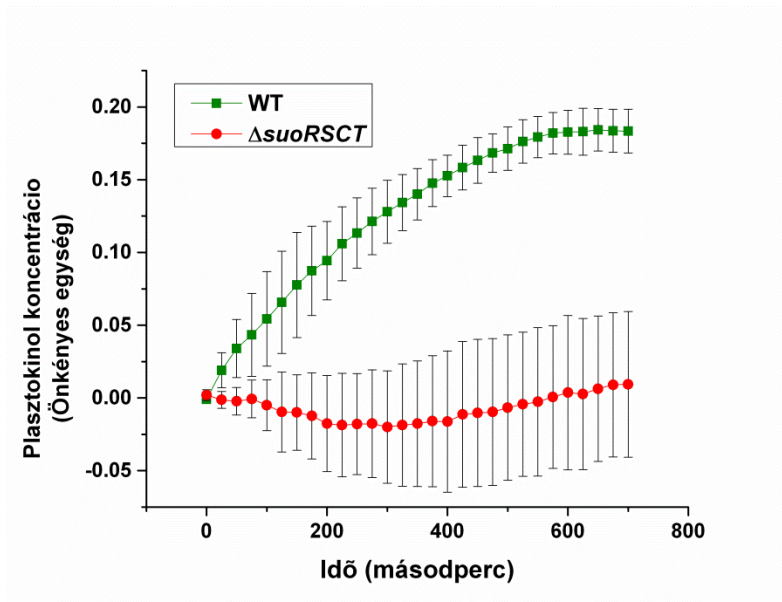
A SuoS enzim elektron donor félreakciójának a tanulmányozásához a szakirodalomban egy már jól kidolgozott módszerhez folyamodtunk (11,71,130): a módszer lényege, hogy a plasztokinol (PQH₂) és plasztokinon (PQ) eltérő hullámhosszaknál mutat abszorpciós maximumot, a PQ 257 nm-nél, a PQH₂ pedig 292nm-nél (20. ábra).



20. Ábra. A plasztokinol/plasztokinon abszorpciós spektruma etanolban. A plasztokinol abszorpciós maximuma 292 nm körül van, míg a plasztokinoné 257 nm-nél. Az ábra módosítva a <http://www.cyberlipid.org/vitk/plas0002.htm> alapján.

Az SQR aktivitás kimutatásához PQ-1-et használtunk, ami a természetes plasztokinonnak egy vízdékony, rövid izoprén oldalláncú változata, amit hasonló, *in vitro* kísérletekhez általánosan használnak (131). Mivel a külsőleg hozzáadott PQ nehezen jut keresztül a sejtfalon, teljes sejtes rendszerek helyett izolált tilakoidokat használtunk (11). Erre a célra szulfiddal kezelt vad típusú és $\Delta suoRSCT$ mutánsokból izolált tilakoidokat használtunk.

Szigorúan anaerob körülmények között spektrofotometriával jól követhető 257 nm-nél a PQ redukáltsági fokának a változása. Azt figyeltük meg, hogy a szulfiddal kezelt vad típusú sejtekből izolált tilakoidok jelenlétében csökkent a PQ mennyiség, tehát növekedett a PQH₂ mennyiség, míg a $\Delta suoRSCT$ mutánsból izolált tilakoidokat tartalmazó minták esetében a PQ szintje nem változott (21. ábra).



21. Ábra. A plasztokinon redukció vad típusú tenyészetből és $\Delta suoRSCT$ mutánsból izolált tilakoidok jelenlétében. A plasztokinol koncentrációja nő a vad típusú sejtek esetében, a $\Delta suoRSCT$ mutánsok esetében a plasztokinol koncentráció nem változik.

Eredményeinket összegezve felállítottuk a SuoS működésének molekuláris modelljét a fentiekben említett *in silico* tanulmányok (3D modellezés), a SuoS *in vivo* és *in vitro* kísérleti eredményei és a jelenlegi szakirodalmi adatok alapján (15. ábra):

- a V₂₈₆-P₃₀₃ aminosavak által közrezárt régió egy úgynevezett „capping loop” struktúrát alkot, ami a hidrogén-szulfid felvételét és az enzim aktív központjába való szállítását biztosítja (64). Ezek mellett Griesbeck és munkatársai (61) helyspecifikus mutagenézissel kimutatták, hogy V₂₈₆-os aminosavnak (a

Rhodobacter capsulatus-ban a Val₃₀₀ homológja) kulcsfontosságú szerepe van az enzim szulfid és kinon iránti affinitásában is.

- A C₁₂₃, C₁₅₅, C₃₄₀ aminosavak szigorúan konzerváltak a prokarióta SQR-ek között és az enzim aktív centrumát képezik. Szerepük elsődlegesen a FAD kofaktor koordinálásában van, valamint a redox reakciók katalizálásában vesznek részt.
- A C₁₅₅ és C₃₄₀ cisztein aminosavak esszenciálisak: amikor Griesbeck és munkatársai (61) pontmutációval kicserélték a homológ aminosavakat (C₁₅₉ és C₃₅₃) a *Rhodobacter capsulatus*-ban az teljesen elveszítette az aktivitását. Ennek a két ciszteinnek a szerepe egy diszulfid híd létrehozása és a hidrogén-szulfid oxidálása, valamint a FAD kofaktor redukálásának a koordinálása. A harmadik konzervált cisztein, a C₁₂₃, főleg a FAD molekula stabilizálásában és a végső poliszulfur termék enzimről való leválasztásában játszik szerepet. A C₁₂₃ kén atomja kovalens kötést alkot a FAD izoalloxazin gyűrűjének C₈M-es atomjával (a FAD C₈-as atomjának metil csoportja) hogy stabilizálja a FAD molekulát.
 - Ahogy bejut a S²⁻ ion az enzim aktív centrumába nukleofil támadást indít a C₁₅₅-S-S⁻-C₃₄₀ szulfid-híd kötésére, ami egy tiol gyököt eredményez a C₁₅₅-ön és egy diszulfidot a C₃₄₀-en.
 - A C₃₄₀-S-S⁻ diszulfid megtámadja a FAD molekula C₄ atomját.
 - Azután a C₁₅₅-S⁻ tiolgyök a C₃₄₀-S-S⁻C₄A-FAD-ot támadja, a FAD disszociálódik és egy triszulfid híd képződik a C₁₅₅-C₃₄₀ között.
 - Ez a reakció addig ismétlődik, amíg egy 8 kénatomos gyűrű képződik, majd ez leválik a C₁₂₃ diszulfid segítségével.

- Brito és *mtsai*. (51) megállapították, hogy az *Acidianus ambivalens* termofil baktérium SQRnek D₂₁₅ és D₃₅₃ aszparaginsavjai szerepet játszanak a hidrogén-szulfid molekula nukleofil természetének a növelésében a fent említett két cisztein aminosav diszulfid-híd kötésére gyakorolt támadásakor (ezek a ciszteinek a C₁₇₈ és C₃₅₀ homológjai az *A. ambivalens* SQR-ben). Ezért feltételezhető, hogy a SuoS enzimben hasonló folyamat zajlik le a hasonló funkciós csoportok katalízisével: az utóbbi aszparaginsav megfelelője a SuoS-ben a D₃₄₆, az előbbit viszont a H₁₉₂ hisztidin helyettesíti a *Synechocystis*ben. Ez az aminosav szubsztitúció lehetséges annak alapján, hogy Griesbeck és *mtsai*. (61) kimutatták, hogy a *R. capsulatus* bíbor kénbaktériumban a megfelelő D₂₁₅-öt funkcionális szempontból helyettesítheti a H₁₉₆ hisztidin.
- Végül pedig Y₁₆₀-E₁₆₁ tirozin-glutaminsav pár (*A. aeolicus* Y₁₆₁-E₁₆₂) (10,64,65) és a K₃₀₄ lizin (51) feltehetőleg ugyancsak fontos szerepet tölt be a szulfid-FAD közötti oxidoredukciós folyamatokban.

Az SQR enzimek működésének elektron donor félreakciója molekuláris szempontból kevésbé ismert, mint az elektron akceptor félreakciója, de a jelenlegi adatok alapján a következő mechanizmus állítható fel:

- A plasztokinon molekula aromás gyűrűjét az I₃₄₉ izoleucin és a F₃₈₃ fenilalanin stabilizálja (*A. aeolicus* I₃₄₆, F₃₈₅).
- Feltehetőleg az E₃₁₀ és K₃₈₀ aminosavak játszanak szerepet a FAD-plasztokinon közötti oxidoredukcióban (*A. aeolicus* E₃₁₈ and K₃₈₂).
- Végül pedig, egy, az I-es típusú SQR-ekre jellemző helix-fordulat-hélix amfipatikus motívumot azonosítottunk a I₃₇₄-V₄₂₈ aminosavak által közrefogva. Az

enzimnek ez az amfipatikus C-terminális része biztosítja a tilakoid membránba való ágyazódását, valamint a kettős hélix révén egy olyan csatornát alkot, ami a plasztokinton felvételében és az enzim aktív centrumába való szállításában játszik szerepet.

- A [hidrogén-szulfid → SQR enzim → plasztokinton] elektrontranszport irányát a donor-akceptor molekulák elektrokémiai jellemzői is alátámasztják, ugyanis a rendszer elemeinek a redoxpotenciálja a következő sorrendben nő: $\text{H}_2\text{S}/\text{S} -140 \text{ mV}$ < $\text{FAD}/\text{FADH}_2 -60 \text{ mV}$ (10) < $\text{PQ}/\text{PQH}_2 +80 \text{ mV}$ (132).

5.2.4. A *suoS* SQR gén szabályzásának a vizsgálata

Annak ellenére, hogy számos organizmus SQR enzime biokémiai, fiziológiai és szerkezeti szempontból alaposan tanulmányozott, nincsen adat a szakirodalomban arról, hogy milyen módon szabályzódik ezeknek az enzimeknek a kifejeződése. Bár a legtöbb stressz-indukált gén pozitív reguláció alatt áll a *Synechocystis*ben (133), a *SuoS* enzim esetében feltehetőleg negatív szabályozás is előfordulhat. Ennek tisztázása érdekében fogtunk neki a *suoS* gén szabályzásának a vizsgálatához.

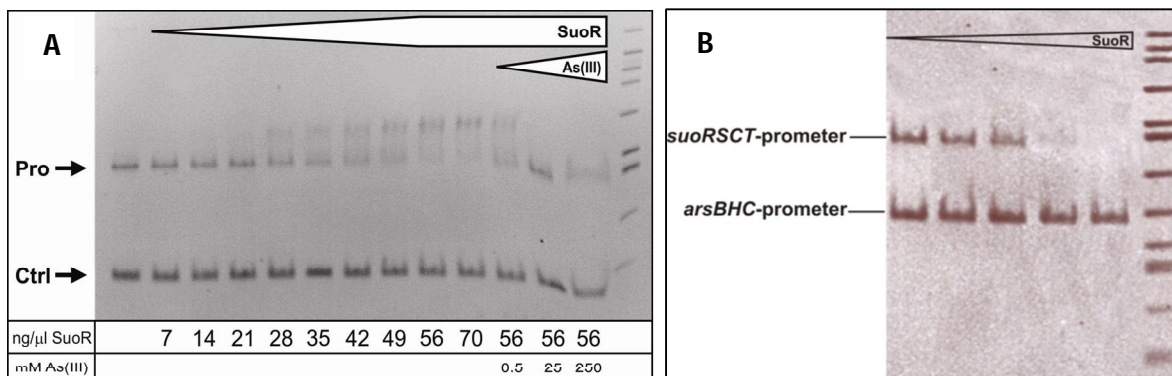
Mivel a *SuoS* SQR egy alternatív fotoszintetikus útvonalat biztosít, a gén kifejeződése feltételezhetően negatív indukció által szabályzott mivel, ahogy a fentiekből is láthattuk, csak a megfelelő körülmények között expresszálódik (17. és 18. ábra). A fenti qRT-PCR-os kísérletekből azt láttuk, hogy a *suoRSCT* operon génjei elsősorban szulfid, arzenit és feltételezhetően nemspecifikusan antimon hatására expresszálódnak. A ΔsuoR mutánssal végzett kísérleteinkből pedig azt láttuk, hogy a *SuoR* hiányában az operon génjei konstitutívan expresszálódnak, tehát a *SuoR* egy represszor fehérje, ami az operon szabályozásáért felelős.

Továbbá, homológia modellezés útján azt is megállapítottuk, hogy a SuoR nagymértékű hasonlóságot mutat ArsR regulátorokkal, amelyek mikroorganizmusokban arzén rezisztenciában töltnek be szabályzó szerepet (75,77,89). ArsR regulátoroknak SQR-el való kapcsoltsága nem ismert a szakirodalomból, ennek tisztázása érdekében további kísérleteket terveztünk. Mivel egyértelművé vált a *suoS* gén szulfiddal kapcsolatos szerepe, felmerült a kérdés, hogy milyen összefüggés áll fenn a *suoRSCT* operon és az arzén között. Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk az operon arzénnal való kapcsolatát, a *suoR* gént egy pET-típusú expressziós rendszerbe klónoztuk, a fehérjét túltermeltük, majd nikkel affinitás kromatográfiával tisztítottuk. A SuoR fehérje szerepét elektroforetikus mobilitás-eltolódással (EMSA) vizsgáltuk.

Azt figyeltük meg (22 A. ábra), hogy a SuoR mennyiségének növelésével csökkent a cél-DNS mobilitása a gélen. Lényegében ezzel a kísérlettel *in vitro* kimutattuk, hogy a SuoR a *suoRSCT* operon represszora. Ebben a kísérletben azt is megfigyelhettük, hogy As(III) jelenlétében disszociálódik a SuoR a cél-DNS-ről, kimutattuk tehát *in vitro* az operon derepresszióját. A SuoR fehérje tehát kölcsönhatásba lép a *suo* operon promoter szakaszát tartalmazó DNS-ével, ami azonban megszűnik arzenit jelenlétében.

Az eredmények során felmerült az a kérdés is, hogy van-e kölcsönhatás a *suoRSCT* operon és az arzén rezisztenciában szerepet játszó *arsBHC* operon génszabályozása között? Ez azért volt valószínűsíthető, mert a SuoR és az *arsBHC* géneket szabályzó transz-helyzetű ArsR is ugyanabba az ArsR fehérje családba tartoznak. Ebből adódóan pedig lehet, hogy a *suo* operon is egy arzén rezisztencia rendszert kódolhat. Egy másik EMSA kísérletben (22 B. ábra) a SuoR fehérjét a *suo* operon promoterét tartalmazó cél DNS-el és az *arsBHC* operon promoterét tartalmazó DNS szakasszal reagáltattuk. Azt találtuk, hogy a SuoR teljesen visszatartja a (specifikus) *suoRSCT* operon promoterét tartalmazó DNS-t a gélen, de nincsen

hatással az *arsBHC* operon promoterére. Nincsen tehát kimutatható kölcsönhatás a két operon szabályzása között, legalábbis a SuoR nincsen befolyással az *arsBHC* gének szabályzására. Feltételezhetően a közös induktort, az arzénit kivéve nincs is más hasonlóság a két operon között. A *suoRSCT* operon egy más, az arzén rezisztenciától eltérő szerepet tölthet be.

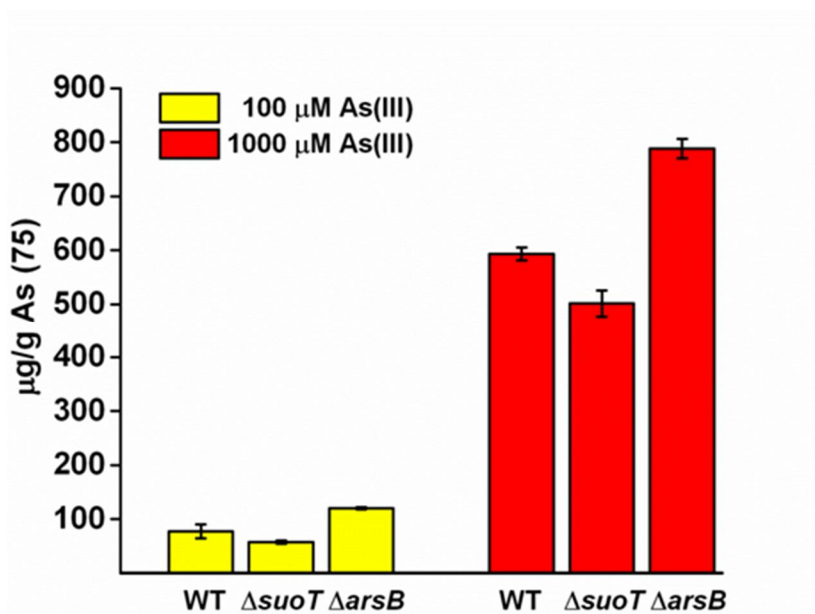


22. Ábra. Elektroforetikus mobilitás-eltolódás. (A) A SuoR fehérje specifikusan a *suo* operon promoter-régiójának DNS-éhez kötődik (Pro) és lecsökkenti a mobilitását a gélen, tehát *in vitro* represszálja az operont. Arzenit As(III) jelenlétében azonban disszociálódik a fehérje a DNS-ről, *in vitro* derepresszálódik az operon, míg a kontrollként használt DNS fragmentum (Ctrl) mobilitása nem változik. (B) A SuoR fehérje teljesen visszatartja a gélből a specifikus *suoRSCT* promoter régiót tartalmazó DNS-t, míg az arzén rezisztenciában szerepet játszó *arsBHC* operon promoter-szekvenciája iránt nem mutat affinitást.

5.3. A *SuoT* membránfehérje arzén anyagcserében betöltött szerepének vizsgálata

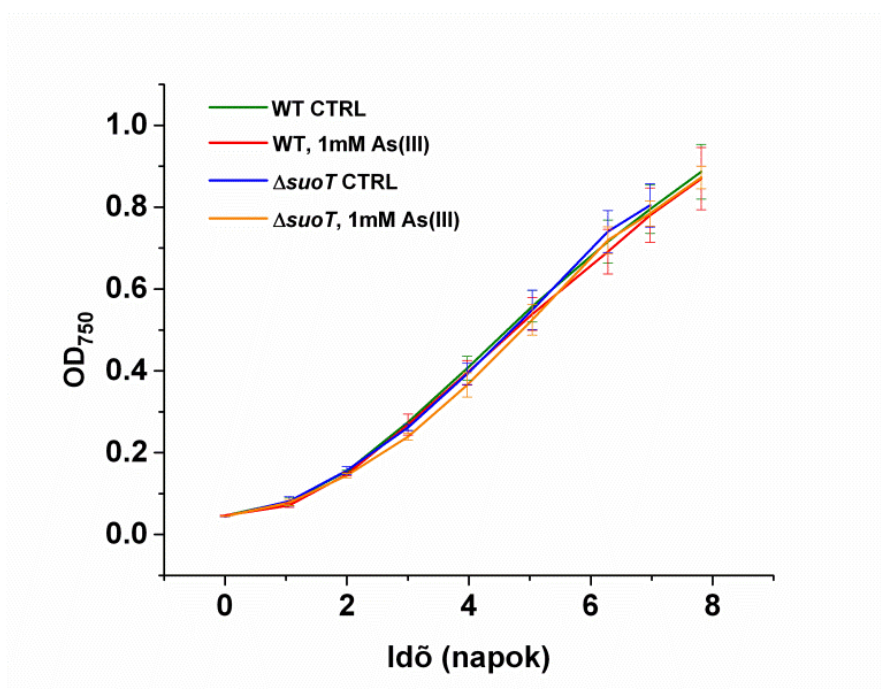
A *Synechocystis* jól jellemzett ArsBHC arzén rezisztencia rendszerének egyik tagja, az ArsB egy integrális membránfehérje, amely kizárólag az As(III) exportjában játszik szerepet (101). Mivel a *SuoT*-nek is hasonló a szerkezete, a membránban való lokalizációja és mivel a *suoT* gén As(III)-ra indukálódik, felmerült, hogy ez a fehérje is rezisztenciát eredményező

detoxifikációs arzén transzportban játszhat szerepet. Ennek tisztázása érdekében egy $\Delta suoT$ mutáns vonalat állítottunk elő és összehasonlítottuk az $\Delta arsB$ mutánsal (101). 100 és 1000 μM As(III)-al kezeltünk vad típusú, $\Delta suoT$ és $\Delta arsB$ tenyészeteket 3 órán keresztül, majd megmértük a sejtek arzén tartalmát induktív csatolású plazma tömegspektrometriával (ICP-MS). Azt találtuk (23. ábra), hogy a feltételezéseinkkel egybehangzóan a $\Delta arsB$ mutáns arzéntartalma nagyobb volt mint a vad típusú sejteké. A $\Delta suoT$ mutáns sejtjei azonban kevesebb arzént tartalmaztak, mint a vad típusúak. A $\Delta arsB$ mutáns megnövekedett arzén koncentrációja érthető, ugyanis az ArsB transzportfehérje hiányában a sejt által felvett arzént nem tudta az ArsBHC arzén rezisztencia rendszer leadni. A $\Delta suoT$ mutáns vad típushoz viszonyított csökkent arzéntartalmából arra következtethetünk, hogy a SuoT egy olyan transzporter, amely az arzén felvételéért lehet felelős.



23. Ábra. Induktív csatolású plazma tömegspektrometriával mért arzén koncentráció a vad típusú tenyészetekben valamint a $\Delta suoT$ és $\Delta arsB$ mutánsokban. A két vizsgált kísérletben (100 és 1000 μM arzenit koncentrációnál) a $\Delta arsB$ mutánsban az ArsB exporter hiányában felhalmozódik az arzén a sejtekben a vad típushoz viszonyítva, míg a $\Delta suoT$ mutánsban a legkisebb az arzén mennyiség. Ez az eredmény arra utal, hogy a SuoT arzén felvételben játszik szerepet.

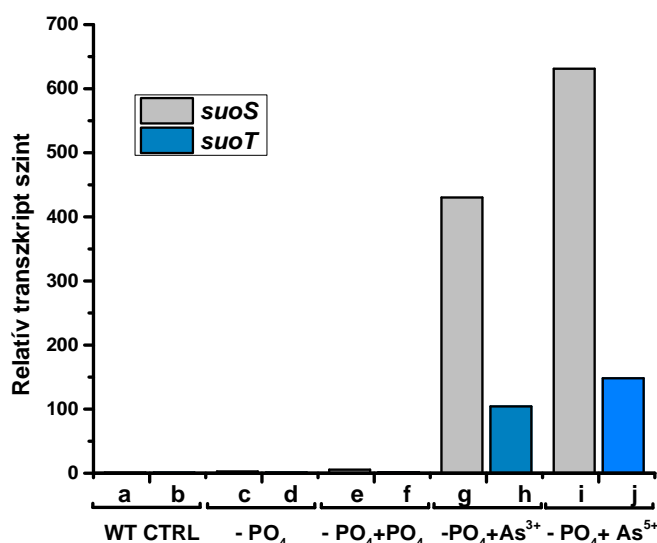
Fontos megjegyezni, hogy az 1 mM As(III) (bár nagyon toxikus a legtöbb mikroorganizmus számára) a *Synechocystis* növekedésére nincsen káros hatással: növekedési kísérleteket végeztünk vad típusú és $\Delta suoT$ mutánsokkal arzén nélkül és 1 mM As(III) jelenlétében és OD₇₅₀-en követtük a növekedésüket 8 napon át. Azt tapasztaltuk, hogy nem volt különbség a vad típusú és a $\Delta suoT$ sejtek növekedése közt függetlenül az arzén jelenlététől (24. ábra).



24. Ábra. A vad típusú és a $\Delta suoT$ mutáns sejtek növekedése arzén kezelés hatására. A vad típusú és a $\Delta suoT$ mutáns tenyészetek egyformán nőnek akkor is, ha 1mM arzénnal kezeljük a tenyészeteket; tehát ez a koncentráció nem káros a sejtekre.

Ezekon a megfigyeléseken kívül a *suo* operon egy másik érdekessége a foszforral való kapcsolatában tűnt fel. A szakirodalomban sok esetben történik utalás a foszfát és az arzénat, As(V) közötti kompetitív kapcsolatra (134-136), sőt felvetődött az az elképzelés is, hogy egyes baktériumokban az arzén helyettesítheti a foszfort a különböző biomolekulákban (137). Bár normális körülmények között nem vettünk észre expressziót az arzénat - As(V) - hatására,

azt tapasztaltuk viszont, hogy, ha megvonjuk a tápoldatból a foszfátot, a *suo* gének igen nagymértékű expressziót mutatnak As(V) jelenlétében, míg önmagában a foszfát hozzáadásától nem indukálódnak (25. ábra). Ez azt sugallja, hogy foszfát hiányában expresszálódik a *suoT* által kódolt transzport fehérje az arzénnek mintegy alternatív tápanyagforrásnak a felvétele céljából, bár ennek a felvetésnek az igazolására további kísérletek szükségesek.

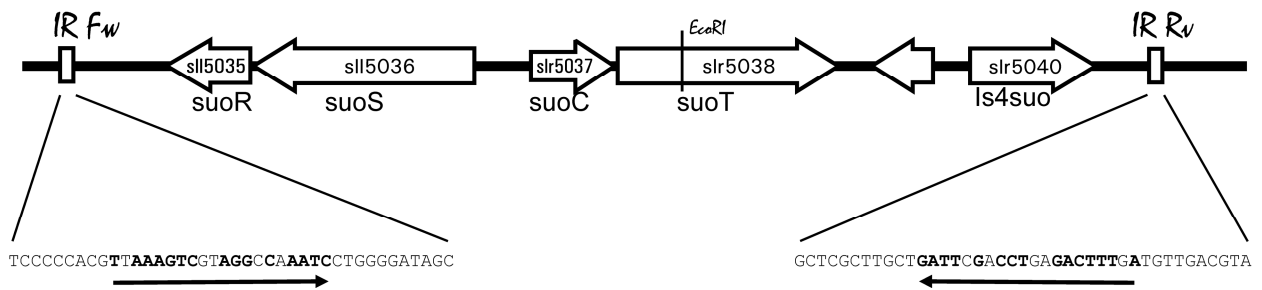


25. Ábra. A *suoS* és *suoT* gének expressziója arzénit és arzenát hatására 24 órás foszfát megvonás esetében. A *suoS* és *suoT* gének nem expresszálódnak a foszfáttal analóg arzenát As(V) jelenlétében csak abban az esetben, ha megvonjuk a foszfátot a tápoldatból (i, j oszlopok). A gének nem expresszálódnak önmagában a foszfát éheztetés hatására (c, d oszlopok) és nem specifikusak a foszfátra sem hiszen, ha 24 órás éheztetés után visszajuttatjuk a normál BG-11 tápoldatra jellemző eredeti foszfát mennyiséget, a gének továbbra sem expresszálódnak (e, f oszlopok). Az ábrán a relatív transzkript szint a *suoS* és *suoT* mRNS-eknek a vad típusú sejtek normál BG-11 tápoldatban mért kezeletlen változatához (a és b oszlopok) viszonyított mennyiségét jelenti.

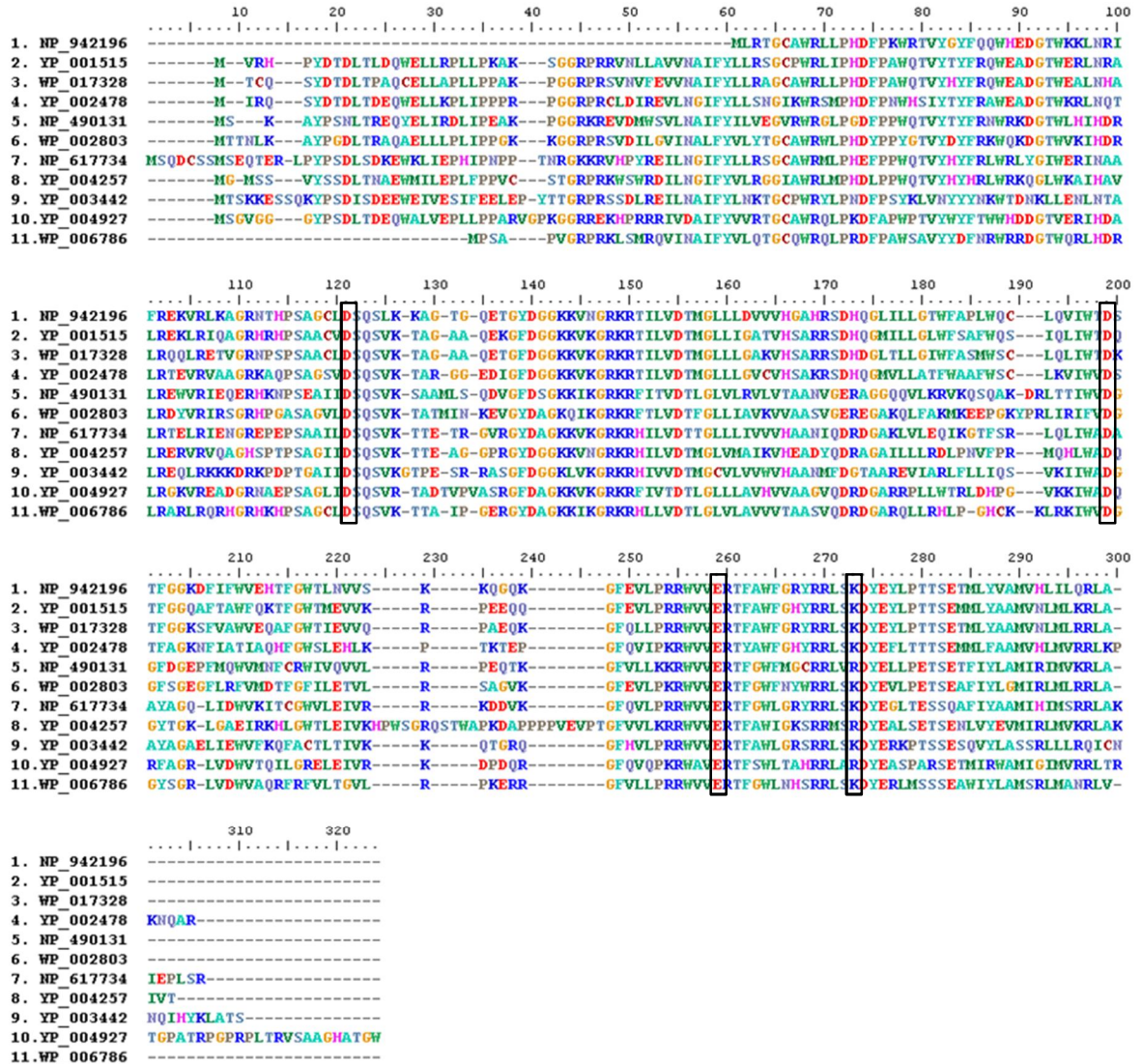
5.4. A *suoRSCT* operon evolúciós eredetének a vizsgálata

In silico analízisek folytán feltűnt, hogy a *suoRSCT* operon egy IS4-típusú mozgékony genetikai elem sajátosságait mutatja: az operon 3' végén a *suoT* géntől 645 bp távolságra egy IS4 típusú transzpozáz génjét találtuk (slr5040) (26. ábra). Ezt a gént IS4*suo*-nak neveztük el és fehérje terméke a DDE transzpozáz család konzervált aminosav elemeit mutatja: D(61)D(109)E(146)K(158) (138,139) (27. ábra). A legtöbb DDE típusú transzpozázt kódoló mozgékony genetikai elemre jellemző, hogy egy rövid, 10-40 bp palindrom szekvencia határolja őket, amelyek jellemzően a transzpozonok vágóhelyeiként szolgálnak (140). Hasonló, 20 bp hosszú palindrom szekvenciák határolják a *suo* operont is (26. ábra). Cassier-Chauvat és *mtsai*. (141) kimutatták, hogy a *Synechocystis*ben az IS4 típusú és egyéb mobilis genetikai elemek fontos szerepet töltek be a genomon belüli és a horizontális géntranszfer útján történő genetikai rekombinációban.

Figyelembe véve a *Synechocystis* nagyfokú természetes transzformálhatóságát (142,143) és a konjugációra való képességét (144), valamint, ha számba vesszük a *Synechocystis* Cyanobase adatbázisban szereplő 128 transzpozáz szekvenciáját, akkor megállapítható, hogy ez a cianobaktérium minden bizonnyal horizontális géntranszfer révén tett szert a SQR-t tartalmazó *suoRSCT* operonra, ami feltehetően evolúciós előnyt biztosított szulfidot vagy arzént tartalmazó környezetben.



26. Ábra. A *suoRSCT* operon környezete egy IS4 típusú mozgékony genetikai elem szerkezeti sajátosságait mutatja. Az *is4suo* egy IS4 típusú transzpozáz kódol. Az IR F_w és IR R_v palindrom DNS szekvenciák, amelyek a transzpozáz hasítási helyeként szolgálnak.



27. Ábra. Különböző mikroorganizmusok DDE transzpozáz szekvenciájának a többszörös illesztése. A konzervált aszparaginsav (D) aszparaginsav (D) glutaminsav (E) és lizin (K) aminosavak keretben vannak feltüntetve. 1. NP_942196 *Synechocystis* sp. PCC 6803 transzpozáz; 2. YP_001515704 *Acaryochloris marina* MBIC11017IS4 transzpozáz; 3. WP_017328254 *Synechococcus* sp. PCC 7336 transzpozáz; 4. YP_002478329 *Cyanothece* sp. PCC 7425 IS4 típusú transzpozáz; 5. NP_490131 *Nostoc* sp. PCC 7120 transzpozáz; 6. WP_002803480 *Microcystis aeruginosa* transzpozáz; 7. NP_617734, *Methanosarcina acetivorans* C2A transzpozáz; 8. YP_004257028 *Deinococcus proteolyticus* MRP IS4 típusú transzpozáz; 9. YP_003442805 *Allochromatium vinosum* DSM 180 transzpozáz-szerű fehérje. 10. YP_004927407 *Streptomyces flavogriseus* ATCC 33331 IS4 típusú transzpozáz; 11. WP_006786249 *Thiorhodospira sibirica* transzpozáz.

6. Az eredmények megvitatása

Cohen, Arieli, Shahak és Oren (10,11,37,38,46,47,68-71,130) kutatásai alapján az 1970-es évek óta ismert, hogy a redukált kén elektronforrásként szolgálhat az oxigenikus fotoszintézist folytató cianobaktériumok számára is. Azonban az, hogy a kimondottan toxikusnak vélt arzén is hozzájárulhat anabolikus folyamatokhoz, rendkívüli felfedezésnek számított (3,145). Ezt azonban az utóbbi években Oremland és munkatársai (3,8,9,40,76,77,113,146,147) által felfedezett újabb mikroorganizmusok, amelyek anyagcseréjükhez fakultatív vagy obligát módon arzént igényelnek, ismét alátámasztják.

Mivel számos esetben magas szulfid tartalmú környezetben arzénvegyületek is előfordulnak néhány mikroorganizmusnál megfigyelték a két elem metabolizmusa közötti kapcsolatot: egyes baktériumok a hidrogén-szulfidot elektron donorként használják ahhoz, hogy az arzenátot - As(V) - arzenitté - As(III) - redukálják és ezáltal energiához juthassanak (111-113,146). Más megfigyelések szerint különböző baktériumok a szulfidot és arzenitet együttesen oxidálják és tioarzenátokat hoznak létre feltehetően egy arzén-detoxifikációs mechanizmus részeként (148). A *Desulfotomaculum auripigmentum* baktérium pedig az arzenátnak - As(V) - arzenitté - As(III) - és a szulfátnak - S(VI) - szulfiddá - S(-II) - való együttes redukálása során As_2S_3 -at képez, feltehetőleg szintén méregtelenítés céljából (149,150).

A jelen dolgozatban egy olyan operont mutatunk be, amelynek génjei, illetve azok szabályzása kapcsolatot teremtenek e két elem (szulfid és arzén) anyagcseréje között. Bár ilyen jellegű genetikai kapcsoltságot nem mutattak ki korábban, homológia és genomi kontextus (GeConT) analízissel megvizsgáltuk, hogy más mikroorganizmusok genomjában

fellelhetők-e hasonlóan kapcsolt gének. A Cyanobase adatbázis szerint 39 cianobaktérium faj genomjának ismert a szekvenciája, ezek közül jelenleg 8-ban található SQR-ekkel homológ fehérje. Ezeket megvizsgálva azonban azt találtuk, hogy egyik SQR génnek sem található a közvetlen közelében ArsR családba tartozó regulátor. Bár az *Oscillatoria limnetica* és az *Aphanothece halophytica* cianobaktériumok teljes genomszekvenciája nem ismert, Bronstein és *mtsai*. (12) munkája alapján megállapítottuk, hogy az a két fehérje szekvencia (AF242370 és AF242371), amelyek a kutatók feltételezése szerint a cianobaktériumok SQR génjének a kifejeződését szabályoznák, szintén az ArsR represszorok családjába tartozik. Az *O. limnetica* ArsR represszora 49%-os, az *A. halophytica* ArsR represszora pedig 47%-os hasonlóságot mutatott a SuoR represszorral. Tehát, annak ellenére, hogy a cianobaktériumok SQR génjei nem feltétlenül asszociálódnak ArsR típusú represszorokkal, előfordulnak olyan fajok, amelyekben ez a kapcsolat fellelhető.

Kérdésként merült fel, hogy vajon mi az oka a két különböző anyagcserében szerepet játszó gén asszociációjának. Szélesebb skálájú genomi kontextus vizsgálatot végezve megnéztük, hogy milyen egyéb mikroorganizmusban lelhető fel hasonló kapcsoltság. Eredményeink azt mutatták, hogy bár nagyon ritka ez az összefüggés, mégis néhány evolúciós szempontból ősi α -proteobaktériumban (*Bradyrhizobium japonicum*, *Bradyrhizobium* sp. BT törzs) és bíbor nem-kén baktériumban (*Rhodopseudomonas palustris*) a két gén egymás szomszédságában helyezkedik el. További vizsgálataink során felleltünk egy olyan baktériumot is, a *Thioalkalivibrio thiocyanodenitrificans*-t, aminek a genomjában - bár nem közvetlenül kapcsolva - fellelhetőek voltak a *suo* operon összes génjei. A *Thioalkalivibrio thiocyanodenitrificans* egy olyan α -proteobaktérium, amely nagyon közeli genetikai rokonságban áll azokkal a kemolitoautotróf szulfid oxidáló baktériumokkal, amelyeket a kaliforniai Mono-tó arzénrel telített kénes melegforrásaiból izoláltak (148). Ezek mellett a

baktériumok mellett Kulp és munkatársai izoláltak olyan *Oscillatoria*-szerű cianobaktériumokat ezekből a tavakból, amelyekről kimutatták, hogy fény és arzenit jelenlétében képesek voltak növekedni (3). Annak ellenére, hogy arzenit-oxidázt nem sikerült azonosítaniuk, az As(III)-alapú anoxigenikus fotoszintézis működése kimutatható volt.

Amint láttuk, a kromát transzporterként nyilvántartott *suoT* gén nem mutat expressziót különböző krómvegyületek vagy egyéb nehézfémek jelenlétében. A *suoT* arzenit hatására expresszálódik és ICP-MS eredményeink szerint arzén felvételében játszik szerepet. Annak ellenére, hogy az arzén nem szolgál energiaforrásként természetes körülmények között a *Synechocystis* számára, a *SuoT* transzporter mégis működőképes. Hatását a kromozómán található *ArsB* exporter kompenzálja, ami egybehangzik azzal a ténnyel, hogy a sejtek számára 1mM koncentrációig még nem toxikus az arzenit és akár 3mM-ig is képes a *Synechocystis* tolerálni az As(III)-at. Ilyen arzén transzporterek fontos funkciót tölthetnek be olyan anaerob körülmények között élő mikroorganizmusokban, amelyek a redukált arzénvegyületeket elektron donorként (107), vagy az oxidált arzénvegyületeket elektron akceptorként (110) használják.

A *SuoT* fehérjének arzenit importban betöltött szerepe mellett az a kutatás is figyelemre méltó, amelyben inaktiválták az *E. coli glpF* aquagliceroporin génjét annak érdekében, hogy az antimon és arzén felvételt tanulmányozzák. A sejt mégis érzékeny maradt az As(III)-re, tehát egy másik transzport rendszer is hozzájárulhat az arzenit felvételhez (86). Megvizsgáltuk az *E. coli* genomját és azt találtuk, hogy megtalálható a *suoT* génnel homológ kromát transzportert kodoló gén, lehetséges tehát, hogy ez járult hozzá a baktérium sejt esetében az arzén felvételéhez.

A szakirodalomból ismertek olyan mikroorganizmusok (pl. *Alkalilimnicola ehrlichii*, *Alkaliphilus oremlandii*), amelyek bár nem rendelkeznek arzenit-oxidázzal, mégis képesek

oxidálni az arzenitet, ami lehetővé teszi számukra a kemotróf módon való táplálkozást (151). Az *A. ehrlichii* egyik arzenát-reduktáza fordítva is működhet, arzenit-oxidázként és végső soron ennek köszönhető az As(III) oxidációja. A *Synechocystis*ben sincsenek arzenit-oxidázok, azonban három különböző arzenát-reduktázt kódoló gén ismert (103), amelyek az eddigi kutatások szerint a cianobaktérium detoxifikációjában játszanak szerepet. Elképzelhető tehát, hogy a *Synechocystis* rendelkezik olyan arzenát-reduktázzal amely arzenit-oxidázként működik.

Azt a feltételezést, miszerint a *suo* operon egy arzenit importáló és oxidáló rendszer elemeként szerepelne, alátámasztja az a tény is, hogy energetikai szempontból a plasztokinon/plasztokinol pár redoxpotenciálja (+80 mV) (132) valamivel pozitívabb mint az arzenit/arzenát pár redoxpotenciálja (+60 mV) (8) így az elektrontranszport a redukált arzéntől az oxidált plasztokinon állomány irányába folyhat.

A *suoRSCT* operon funkciójának, szerkezetének és feltételezett evolúciós eredetének tükrében megállapíthatjuk, hogy ez az operon mintegy relikviája, maradványa olyan anaerob anyagcsere folyamatoknak, amelyek a cianobaktériumok megjelenése előtti kezdetleges földi élet kialakulására voltak jellemzőek. A redukált kén- és arzénvegyületek máig számos mikroorganizmus számára szolgálnak elektrondorként anyagcsere folyamataikhoz, de a földtörténeti archaikum idején valamint a proterozoikum kezdetén megjelenő mikroorganizmusok számára lényegében kizárólagos tápanyagforrásként szolgáltak. A földtörténet során többször következtek be olyan geokémiai körülmények, kataklizmák, amelyek eredményeként újra teret hódított az anaerob környezet. Paleoökológiai szempontból is rendkívül érdekes, hogy az egyébként aerob fotosztintetikus anyagcserét folytató *Synechocystis* genomjában megőrződött egy olyan operon, amely két, evolúciós szempontból

ősi, anaerob anyagcsereútat kódol. A *suo* operon jelenléte és működőképessége annak bizonyítéka, hogy evolúciós előnyt szolgáltatott a *Synechocystis* számára szélsőséges módon változó környezeti feltételek között.

7. Következtetések

1. A *suoRSCT* operon génjeinek expressziós vizsgálatával kimutattuk, hogy az operon aktív, mivel a gének specifikus induktorok hatására kifejeződnek. A vizsgált, potenciális vegyületek közül a *suo* operon génjei csak az arzén és kén redukált formáira, As(III)-ra és szulfidra indukálódnak, azaz olyan vegyületekre, amelyek más mikroorganizmusok anyagcserefolyamataiban elektron donorként hasznosulnak.
2. A *SuoS* enzim vizsgálatából kiderült, hogy *SQR* aktivitása van: képes *in vivo* oxidálni a környezetben levő hidrogén-szulfidot és az így nyert elektronokkal a plasztokinon állományt redukálja. Azt is bizonyítottuk, hogy a *SuoS* enzim működésén alapuló anyagcsere a fény jelenlétéhez kötött, tehát a *Synechocystis* képes áttérni egy szulfid alapú „bakteriális típusú” alternatív fotoszintézisre.
3. Kimutattuk, hogy a *SuoS* *SQR* enzimet kódoló *suoRSCT* egy negatív szabályozás alatt álló indukálható operon, mivel a gének a *SuoR* represszornak gátlása alatt állnak induktor vegyületek hiányában. Azonban ez a represszor az *ArsR* fehérjék családjába tartozik, amelyek általában különböző baktériumok arzén-rezisztencia génjeinek a kifejeződését szabályozzák.
4. Bebizonyítottuk, hogy nincsen genetikai szintű kapcsolat a *Synechocystis arsBHC* génjei által kódolt arzén-rezisztencia rendszer és a *suoRSCT* operonok szabályozása között. Ez érthető is, mivel csak az induktor közös a két operonban,

funkciójuk eltér egymástól. A *suo* gének tehát nem arzén rezisztenciában vesznek részt.

5. Annak ellenére, hogy a *suoT* gén terméke kromát transzporterként van nyilvántartva, a gén nem indukálódik krómvegyületek jelenlétében. Kimutattuk azonban, hogy a *SuoT*-nek arzén felvételben van szerepe, ami olyan anaerob körülmények között élő mikroorganizmusokra lehet jellemző, amelyek a redukált arzénvegyületeket elektron donorként vagy az oxidált arzénvegyületeket elektron akzeptorként használják életfolyamataikhoz.
6. Kimutattuk továbbá, hogy a *suoRSCT* operon környezete olyan DNS régiókat tartalmaz, amelyek IS4 típusú mozgékony genetikai elemekre jellemzőek. Mivel a mikroorganizmusok között a horizontális géntranszfer igen gyakori, feltehetőleg a *Synechocystis suo* operonja is egy olyan mikroorganizmustól származhatott, amely szulfiddal és/vagy arzénnel telített anaerob környezetből származott. A *suo* operon jelenléte és működőképessége annak bizonyítéka, hogy evolúciós előnyt biztosíthatott a *Synechocystis* számára szélsőséges módon változó környezeti feltételek között.

8. A dolgozatban felhasznált közlemények

Nagy, Cs. I., Vass, I., Rákhely, G., Vass, I. Z., Tóth, A., Duzs, A., Peca, L., Kruk, J., Kós, P. B., 2014: Co-regulated genes link sulfide:quinone oxidoreductase and arsenic metabolism in *Synechocystis* sp. PCC6803. 196(19):3430-40, *J Bacteriol* IF: 3.298

Loredana Peca, Csaba István Nagy, Attila Ördög, Imre Vass, Péter B. Kós, 2014: Development of a bioluminescent cyanobacterial reporter strain for detection of arsenite, arsenate, and antimonite. *Environmental Engineering and Management Journal*. (in press, publikálás alatt) IF: 1.258

Egyéb publikációk:

Vass, I. Z., Kós, P. B., Sass, L., Nagy, Cs. I., Vass I., 2012: The Ability of cyanobacterial cells to restore UV-B radiation induced damage to photosystem II is influenced by photolyase dependent DNA repair. *Photochem Photobiol*. IF: 2.684

Nagy, Cs. I., Lupan I., Ferencz B., Popescu O., 2007: Cloning and expression of the gene encoding phosphoketolase in *Pseudomonas aeruginosa* 15442, *Annals of West University of Timișoara – Series of Chemistry* 16 (3) 73-80.

Nagy, Cs. I., Ferencz B., Lupan I., Popescu O., 2007: Cloning of the gene for phosphoketolase in *Synechocystis* sp. PCC6803. *Anal. Soc. Naț. Biol. Cel.* 11.

Előadások tudományos konferenciákon

Csaba István Nagy, Péter B. Kós, István Z. Vass, Imre Vass: A novel plasmid-borne arsenite and antimonite responsive operon in *Synechocystis* sp. PCC6803. 14th International Symposium on Phototrophic Prokaryotes, Porto, Portugal, August 5-10, 2012.

Csaba I. Nagy, Imre Vass, Gábor Rákhely, István Zoltán Vass, András Tóth, Ágnes Duzs, Loredana Peca, Péter B. Kós: Co-regulated sulfide- and arsenic responsive genes represent relics of an ancient anaerobic metabolism in *Synechocystis* sp. PCC6803. 15th Biology Days (Conference), Cluj-Napoca, Romania, 2014. April 04-06.

Csaba I. Nagy, Imre Vass, Gábor Rákhely, István Zoltán Vass, András Tóth, Ágnes Duzs, Loredana Peca, Peter B. Kós: Functional link between sulfide- and arsenic metabolism in cyanobacteria. Straub-Days, Biological Research Centre, Szeged, Hungary, May 28-29, 2014.

Csaba I. Nagy, Imre Vass, Gábor Rákhely, István Zoltán Vass, András Tóth, Ágnes Duzs, Péter B. Kós: Co-regulated genes link sulfide:quinone oxidoreductase and arsenic metabolism in *Synechocystis* sp. PCC6803. 9th European Workshop on the Molecular Biology of Cyanobacteria. Texel, The Netherlands, 7-11 September, 2014.

Poszter bemutatások tudományos konferenciákon

Nagy, Cs. I., Lupan I., Ferencz B., Popescu O., 2007: Cloning and expression of the gene encoding phosphoketolase in *Pseudomonas aeruginosa* 15442. The Annual International Conference of the Romanian Society of Biochemistry and Molecular Biology, Timișoara, Romania, 2007.

Csaba István Nagy, Péter B. Kós, Loredana Peca, Imre Vass: A novel arsenic responsive operon in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. 8th European Workshop on Molecular Biology of Cyanobacteria, Naantali, Finland, August 28 – September 1, 2011.

Csaba István Nagy, Imre Vass, Péter B. Kós: Genetic and functional analysis of a sulfide:quinone oxidoreductase enzyme in *Synechocystis* sp. PCC6803. 4th Central European Forum for Microbiology, Keszthely, Hungary, October 16-18, 2013.

Irodalomjegyzék

1. **Anbar, A. D. and A. H. Knoll.** 2002. Proterozoic ocean chemistry and evolution: a bioinorganic bridge? *Science*. **297**:1137-1142.
2. **Theissen, U., M. Hoffmeister, M. Grieshaber, and W. Martin.** 2003. Single eubacterial origin of eukaryotic sulfide:quinone oxidoreductase, a mitochondrial enzyme conserved from the early evolution of eukaryotes during anoxic and sulfidic times. *Mol.Biol.Evol.* **20**:1564-1574.
3. **Kulp, T. R., S. E. Hoefft, M. Asao, M. T. Madigan, J. T. Hollibaugh, J. C. Fisher, J. F. Stolz, C. W. Culbertson, L. G. Miller, and R. S. Oremland.** 2008. Arsenic(III) fuels anoxygenic photosynthesis in hot spring biofilms from Mono Lake, California. *Science*. **321**:967-970.
4. **Griffin, B. M., J. Schott, and B. Schink.** 2007. Nitrite, an electron donor for anoxygenic photosynthesis. *Science*. **316**:1870.
5. **Bird, L. J., V. Bonnefoy, and D. K. Newman.** 2011. Bioenergetic challenges of microbial iron metabolisms. *Trends Microbiol.* **19**:330-340.
6. **Ehrenreich, A. and F. Widdel.** 1994. Anaerobic oxidation of ferrous iron by purple bacteria, a new type of phototrophic metabolism. *Appl.Environ.Microbiol.* **60**:4517-4526.
7. **Griesbeck, C., G. Hauska, and M. Schütz.** 2000. Biological Sulfide Oxidation: Sulfide-Quinone Reductase (SQR), the Primary Reaction, p. 179-203. *In*: S. G. Pandalai (ed.), Recent Research Developments in Microbiology., vol. 4. Research Signpost, Trivandrum, India.
8. **van Lis R., W. Nitschke, S. Duval, and B. Schoepp-Cothenet.** 2013. Arsenics as bioenergetic substrates. *Biochim.Biophys.Acta.* **1827**:176-188.
9. **Lebrun, E., M. Brugna, F. Baymann, D. Muller, D. Lievreumont, M. C. Lett, and W. Nitschke.** 2003. Arsenite oxidase, an ancient bioenergetic enzyme. *Mol.Biol.Evol.* **20**:686-693.
10. **Shahak, Y. and G. Hauska.** 2008. Sulfide Oxidation from Cyanobacteria to Humans: Sulfide-Quinone Oxidoreductase (SQR), p. 319-335. *In*: R. Hell, C. Dahl, D. B. Knaff, and T. Leustek (eds.). Springer.
11. **Arieli, B., E. Padan, and Y. Shahak.** 1991. Sulfide-induced sulfide-quinone reductase activity in thylakoids of *Oscillatoria limnetica*. *J.Biol.Chem.* **266**:104-111.
12. **Bronstein, M., M. Schutz, G. Hauska, E. Padan, and Y. Shahak.** 2000. Cyanobacterial sulfide-quinone reductase: cloning and heterologous expression. *J.Bacteriol.* **182**:3336-3344.
13. **Ducluzeau, A. L., B. Schoepp-Cothenet, F. Baymann, M. J. Russell, and W. Nitschke.** 2014. Free energy conversion in the LUCA: Quo vadis? *Biochim.Biophys.Acta.* **1837**:982-988.
14. **Koskela, M. and A. Annala.** 2012. Looking for the Last Universal Common Ancestor (LUCA). *Genes (Basel).* **3**:81-87.

15. **De Marais, D. J.** 2000. Evolution. When did photosynthesis emerge on Earth? *Science*. **289**:1703-1705.
16. **Dismukes, G. C., V. V. Klimov, S. V. Baranov, Y. N. Kozlov, J. DasGupta, and A. Tyrshkin.** 2001. The origin of atmospheric oxygen on Earth: the innovation of oxygenic photosynthesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **98**:2170-2175.
17. **Campbell, D., V. Hurry, A. K. Clarke, P. Gustafsson, and G. Oquist.** 1998. Chlorophyll fluorescence analysis of cyanobacterial photosynthesis and acclimation. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **62**:667-683.
18. **Knoll, A. H.** 2008. Cyanobacteria and Earth History, p. 1-21. *In*: A. F. E. Herrero (ed.), *The Cyanobacteria: Molecular Biology, Genomics, and Evolution*. Caister Academic Press, Norfolk, UK.
19. **Badger, M. R., G. D. Price, B. M. Long, and F. J. Woodger.** 2006. The environmental plasticity and ecological genomics of the cyanobacterial CO₂ concentrating mechanism. *J.Exp.Bot.* **57**:249-265.
20. **Whitton, B. A. and M. Potts.** 2002. *Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space*. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, Netherlands.
21. **Utkilen, H. C.** 1976. Thiosulphate as electron donor in the blue-green alga *Anacystis nidulans*. *J.Gen.Microbiol.* **95**:177-180.
22. **Bandyopadhyay, A., J. Stockel, H. Min, L. A. Sherman, and H. B. Pakrasi.** 2010. High rates of photobiological H₂ production by a cyanobacterium under aerobic conditions. *Nat.Comm.* **1**:139. doi: [10.1038/ncomms1139](https://doi.org/10.1038/ncomms1139).:139.
23. **Vermaas, W. F. J.** 2001. Photosynthesis and respiration in cyanobacteria, *In*: *Encyclopedia of Life Sciences*. Macmillan Publisher Ltd, Nature Publishing Group.
24. **Raven, J. A. and J. F. Allen.** 2003. Genomics and chloroplast evolution: what did cyanobacteria do for plants? *Genome Biol.* **4**:209.
25. **Kasting, J. F. and J. L. Siefert.** 2002. Life and the evolution of Earth's atmosphere. *Science*. **296**:1066-1068.
26. **Kumar, K., R. A. Mella-Herrera, and J. W. Golden.** 2010. Cyanobacterial heterocysts. *Cold Spring Harb.Perspect.Biol.* **2**:a000315.
27. **Schopf, J. W.** 2012. The Fossil Record of Cyanobacteria, p. 15-37. *In*: B. A. Whitton (ed.), *Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time*. Springer Dordrecht Heidelberg London New York.
28. **Charpy, L., B. E. Casareto, M. J. Langlade, and Y. Suzuki.** 2012. Cyanobacteria in Coral Reef Ecosystems: A Review. *Journal of Marine Biology*.
29. **BERGMAN, B., C. JOHANSSON, and E. SODERBACK.** 1992. The Nostoc-Gunnere symbiosis. *New Phytologist* **122**:379-400.

30. **Peters, G. A. and J. C. Meeks.** 1989. The Azolla-Anabaena Symbiosis: Basic Biology. Annual.Review of Plant Physiology.and Plant Molecular.Biology June.193.
31. **O'Brien, H. E., J. Miadlikowska, and F. Lutzoni.** 2013. Assessing population structure and host specialization in lichenized cyanobacteria. *New Phytol.* **198**:557-566.
32. **Tice, M. M. and D. R. Lowe.** 2004. Photosynthetic microbial mats in the 3,416-Myr-old ocean. *Nature.* **431**:549-552.
33. **Xiong, J., W. M. Fischer, K. Inoue, M. Nakahara, and C. E. Bauer.** 2000. Molecular evidence for the early evolution of photosynthesis. *Science.* **289**:1724-1730.
34. **Olson, J. M.** 2006. Photosynthesis in the Archean era. *Photosynth.Res.* **88**:109-117.
35. **Reinartz, M., J. Tschape, T. Bruser, H. G. Truper, and C. Dahl.** 1998. Sulfide oxidation in the phototrophic sulfur bacterium *Chromatium vinosum*. *Arch.Microbiol.* **170**:59-68.
36. **Schütz, M., Y. Shahak, E. Padan, and G. Hauska.** 1997. Sulfide-quinone reductase from *Rhodobacter capsulatus*. Purification, cloning, and expression. *J.Biol.Chem.* **272**:9890-9894.
37. **Shahak, Y., C. Klughammer, U. Schreiber, E. Padan, I. Herrman, and G. Hauska.** 1994. Sulfide-quinone and sulfide-cytochrome reduction in *Rhodobacter capsulatus*. *Photosynth.Res.* **39**:175-181.
38. **Shahak, Y., B. Arieli, E. Padan, and G. Hauska.** 1992. Sulfide quinone reductase (SQR) activity in *Chlorobium*. *FEBS Lett.* **299**:127-130.
39. **Beatty, J. T., J. Overmann, M. T. Lince, A. K. Manske, A. S. Lang, R. E. Blankenship, C. L. Van Dover, T. A. Martinson, and F. G. Plumley.** 2005. An obligately photosynthetic bacterial anaerobe from a deep-sea hydrothermal vent. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **102**:9306-9310.
40. **Oremland R.S., Saltikov C.W., Wolfe-Simon F., and Stolz J.F.** 2009. Arsenic in the Evolution of Earth and Extraterrestrial Ecosystems. *Geomicrobiology Journal* **26**:522-536.
41. **Beauchamp, R. O., Jr., J. S. Bus, J. A. Popp, C. J. Boreiko, and D. A. Andjelkovich.** 1984. A critical review of the literature on hydrogen sulfide toxicity. *Crit Rev.Toxicol.* **13**:25-97.
42. **Bagarinao, T.** 1992. Sulfide as an environmental factor and toxicant: tolerance and adaptations in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology* **24**:21-62.
43. **Lewis, A. E.** 2010. Review of metal sulphide precipitation. *Hydrometallurgy* **104**:222-234.
44. **Wagner, F., P. Asfar, E. Calzia, P. Radermacher, and C. Szabo.** 2009. Bench-to-bedside review: Hydrogen sulfide--the third gaseous transmitter: applications for critical care. *Crit Care.* **13**:213.
45. **Reiffenstein, R. J., W. C. Hulbert, and S. H. Roth.** 1992. Toxicology of hydrogen sulfide. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* **32**:109-34.:109-134.
46. **Arieli, B., B. Binder, Y. Shahak, and E. Padan.** 1989. Sulfide induction of synthesis of a periplasmic protein in the cyanobacterium *Oscillatoria limnetica*. *J.Bacteriol.* **171**:699-702.

47. **Cohen, Y., B. B. JORGENSEN, N. P. Revsbech, and R. Poplawski.** 1986. Adaptation to Hydrogen Sulfide of Oxygenic and Anoxygenic Photosynthesis among Cyanobacteria. *Appl.Environ.Microbiol.* **51**:398-407.
48. **Jackson, M. R., S. L. Melideo, and M. S. Jorns.** 2012. Human sulfide:quinone oxidoreductase catalyzes the first step in hydrogen sulfide metabolism and produces a sulfane sulfur metabolite. *Biochemistry.* **51**:6804-6815.
49. **Wang, R.** 2002. Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB J.* **16**:1792-1798.
50. **Canfield, D. E.** 1998. A new model for Proterozoic ocean chemistry. *Nature*450-453.
51. **Brito, J. A., F. L. Sousa, M. Stelter, T. M. Bandejas, C. Vonrhein, M. Teixeira, M. M. Pereira, and M. Archer.** 2009. Structural and functional insights into sulfide:quinone oxidoreductase. *Biochemistry.* **48**:5613-5622.
52. **Wakai, S., M. Kikumoto, T. Kanao, and K. Kamimura.** 2004. Involvement of sulfide:quinone oxidoreductase in sulfur oxidation of an acidophilic iron-oxidizing bacterium, *Acidithiobacillus ferrooxidans* NASF-1. *Biosci.Biotechnol.Biochem.* **68**:2519-2528.
53. **Nübel, T., C. Klughammer, R. Huber, G. Hauska, and M. Schutz.** 2000. Sulfide:quinone oxidoreductase in membranes of the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus* (VF5). *Arch.Microbiol.* **173**:233-244.
54. **Shibata, H. and S. Kobayashi.** 2006. Characterization of a HMT2-like enzyme for sulfide oxidation from *Pseudomonas putida*. *Can.J.Microbiol.* **52**:724-730.
55. **Vande Weghe, J. G. and D. W. Ow.** 1999. A fission yeast gene for mitochondrial sulfide oxidation. *J.Biol.Chem.* **274**:13250-13257.
56. **Grieshaber, M. K. and S. Volkel.** 1998. Animal adaptations for tolerance and exploitation of poisonous sulfide. *Annu.Rev.Physiol.* **60:33-53**.:33-53.
57. **Theissen, U. and W. Martin.** 2008. Sulfide : quinone oxidoreductase (SQR) from the lugworm *Arenicola marina* shows cyanide- and thioredoxin-dependent activity. *FEBS J.* **275**:1131-1139.
58. **Ma, Y. B., Z. F. Zhang, M. Y. Shao, K. H. Kang, Z. Tan, and J. L. Li.** 2011. Sulfide:quinone oxidoreductase from echiuran worm *Urechis unicinctus*. *Mar.Biotechnol.(NY).* **13**:93-107.
59. **Wächtershauser, G.** 2006. From volcanic origins of chemoautotrophic life to Bacteria, Archaea and Eukarya. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* **361**:1787-1806.
60. **Wang, W., B. Yang, Y. Qu, X. Liu, and W. Su.** 2011. FeS/S/FeS(2) redox system and its oxidoreductase-like chemistry in the iron-sulfur world. *Astrobiology.* **11**:471-476.
61. **Griesbeck, C., M. Schutz, T. Schodl, S. Bathe, L. Nausch, N. Mederer, M. Vielreicher, and G. Hauska.** 2002. Mechanism of sulfide-quinone reductase investigated using site-directed mutagenesis and sulfur analysis. *Biochemistry.* **41**:11552-11565.

62. **Schütz, M., C. Klughammer, C. Griesbeck, A. Quentmeier, C. G. Friedrich, and G. Å. Hauska.** 1998. Sulfide-quinone reductase activity in membranes of the chemotrophic bacterium *Paracoccus denitrificans* GB17. *Arch.Microbiol.* **170**:353-360.
63. **Pham, V. H., J. J. Yong, S. J. Park, D. N. Yoon, W. H. Chung, and S. K. Rhee.** 2008. Molecular analysis of the diversity of the sulfide : quinone reductase (sqr) gene in sediment environments. *Microbiology.* **154**:3112-3121.
64. **Marcia, M., U. Ermler, G. Peng, and H. Michel.** 2010. A new structure-based classification of sulfide:quinone oxidoreductases. *Proteins.* **78**:1073-1083.
65. **Marcia, M., U. Ermler, G. Peng, and H. Michel.** 2009. The structure of *Aquifex aeolicus* sulfide:quinone oxidoreductase, a basis to understand sulfide detoxification and respiration. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **106**:9625-9630.
66. **Cherney, M. M., Y. Zhang, M. Solomonson, J. H. Weiner, and M. N. James.** 2010. Crystal structure of sulfide:quinone oxidoreductase from *Acidithiobacillus ferrooxidans*: insights into sulfidotrophic respiration and detoxification. *J.Mol.Biol.* **398**:292-305.
67. **Lencina, A. M., Z. Ding, L. A. Schurig-Briccio, and R. B. Gennis.** 2012. Characterization of the Type III sulfide:quinone oxidoreductase from *Caldivirga maquilingensis* and its membrane binding. *Biochim.Biophys.Acta.* **1827**:266-275.
68. **Cohen, Y., E. Padan, and M. Shilo.** 1975. Facultative anoxygenic photosynthesis in the cyanobacterium *Oscillatoria limnetica*. *J.Bacteriol.* **123**:855-861.
69. **Oren, A. and E. Padan.** 1978. Induction of anaerobic, photoautotrophic growth in the cyanobacterium *Oscillatoria limnetica*. *J.Bacteriol.* **133**:558-563.
70. **Cohen, Y., B. B. JORGENSEN, E. Padan, and M. Shilo.** 1975. Sulphide-dependent anoxygenic photosynthesis in the cyanobacterium *Oscillatoria limnetica*. *Nature.*
71. **Arieli, B., Y. Shahak, D. Taglicht, G. Hauska, and E. Padan.** 1994. Purification and characterization of sulfide-quinone reductase, a novel enzyme driving anoxygenic photosynthesis in *Oscillatoria limnetica*. *J.Biol.Chem.* **269**:5705-5711.
72. **Garlick, S., A. Oren, and E. Padan.** 1977. Occurrence of facultative anoxygenic photosynthesis among filamentous and unicellular cyanobacteria. *J.Bacteriol.* **129**:623-629.
73. **Marcia, M., J. D. Langer, D. Parcej, V. Vogel, G. Peng, and H. Michel.** 2010. Characterizing a monotopic membrane enzyme. Biochemical, enzymatic and crystallization studies on *Aquifex aeolicus* sulfide:quinone oxidoreductase. *Biochim.Biophys.Acta.* **1798**:2114-2123.
74. **Chan, L. K., R. M. Morgan-Kiss, and T. E. Hanson.** 2009. Functional analysis of three sulfide:quinone oxidoreductase homologs in *Chlorobaculum tepidum*. *J.Bacteriol.* **191**:1026-1034.
75. **Mukhopadhyay, R., B. P. Rosen, L. T. Phung, and S. Silver.** 2002. Microbial arsenic: from geocycles to genes and enzymes. *FEMS Microbiol.Rev.* **26**:311-325.

76. **Stolz, J. F., P. Basu, J. M. Santini, and R. S. Oremland.** 2006. Arsenic and selenium in microbial metabolism. *Annu.Rev.Microbiol.* **60:107-30.**:107-130.
77. **Oremland, R. S. and J. F. Stolz.** 2003. The ecology of arsenic. *Science.* **300**:939-944.
78. **Slyemi, D. and V. Bonnefoy.** 2012. How prokaryotes deal with arsenic. *Environ.Microbiol.Rep.* **4**:571-586.
79. **Dopp, E., R. U. von, R. Diaz-Bone, A. V. Hirner, and A. W. Rettenmeier.** 2010. Cellular uptake, subcellular distribution and toxicity of arsenic compounds in methylating and non-methylating cells. *Environ.Res.* **110**:435-442.
80. **Thiel, T.** 1988. Phosphate transport and arsenate resistance in the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *J.Bacteriol.* **170**:1143-1147.
81. **Yang, H. C., H. L. Fu, Y. F. Lin, and B. P. Rosen.** 2012. Pathways of arsenic uptake and efflux. *Curr.Top.Membr.* **69:325-58.** doi: [10.1016/B978-0-12-394390-3.00012-4](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394390-3.00012-4).:325-358.
82. **Rosen, B. P. and Z. Liu.** 2009. Transport pathways for arsenic and selenium: a minireview. *Environ.Int.* **35**:512-515.
83. **Pitt, F. D., S. Mazard, L. Humphreys, and D. J. Scanlan.** 2010. Functional characterization of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 *pst1* and *pst2* gene clusters reveals a novel strategy for phosphate uptake in a freshwater cyanobacterium. *J.Bacteriol.* **192**:3512-3523.
84. **Burut-Archanai, S., J. J. Eaton-Rye, and A. Incharoensakdi.** 2011. Na⁺-stimulated phosphate uptake system in *Synechocystis* sp. PCC 6803 with *Pst1* as a main transporter. *BMC.Microbiol.* **11:225.** doi: [10.1186/1471-2180-11-225](https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-225).:225-11.
85. **Sanchez-Riego, A. M., L. Lopez-Maury, and F. J. Florencio.** 2014. Genomic responses to arsenic in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *PLoS.One.* **9**:e96826.
86. **Sanders, O. I., C. Rensing, M. Kuroda, B. Mitra, and B. P. Rosen.** 1997. Antimonite is accumulated by the glycerol facilitator *GlpF* in *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* **179**:3365-3367.
87. **Wysocki, R., C. C. Chery, D. Wawrzycka, H. M. Van, R. Cornelis, J. M. Thevelein, and M. J. Tamas.** 2001. The glycerol channel *Fps1p* mediates the uptake of arsenite and antimonite in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Microbiol.* **40**:1391-1401.
88. **Rosen, B. P.** 1999. Families of arsenic transporters. *Trends Microbiol.* **7**:207-212.
89. **Rosen, B. P.** 2002. Biochemistry of arsenic detoxification. *FEBS Lett.* **529**:86-92.
90. **Paez-Espino, D., J. Tamames, L. de, V, and D. Canovas.** 2009. Microbial responses to environmental arsenic. *Biometals.* **22**:117-130.
91. **Xu, C., T. Zhou, M. Kuroda, and B. P. Rosen.** 1998. Metalloid resistance mechanisms in prokaryotes. *J.Biochem.* **123**:16-23.
92. **Ji, G. and S. Silver.** 1992. Regulation and expression of the arsenic resistance operon from *Staphylococcus aureus* plasmid pI258. *J.Bacteriol.* **174**:3684-3694.

93. **Touw, D. S., C. E. Nordman, J. A. Stuckey, and V. L. Pecoraro.** 2007. Identifying important structural characteristics of arsenic resistance proteins by using designed three-stranded coiled coils. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **104**:11969-11974.
94. **Busenlehner, L. S., M. A. Pennella, and D. P. Giedroc.** 2003. The SmtB/ArsR family of metalloregulatory transcriptional repressors: Structural insights into prokaryotic metal resistance. *FEMS Microbiol.Rev.* **27**:131-143.
95. **Shi, W., J. Wu, and B. P. Rosen.** 1994. Identification of a putative metal binding site in a new family of metalloregulatory proteins. *J.Biol.Chem.* **269**:19826-19829.
96. **Wu, J. and B. P. Rosen.** 1993. The *arsD* gene encodes a second trans-acting regulatory protein of the plasmid-encoded arsenical resistance operon. *Mol.Microbiol.* **8**:615-623.
97. **Chen, Y. and B. P. Rosen.** 1997. Metalloregulatory properties of the *ArsD* repressor. *J.Biol.Chem.* **272**:14257-14262.
98. **Lin, Y. F., J. Yang, and B. P. Rosen.** 2007. *ArsD*: an As(III) metallochaperone for the *ArsAB* As(III)-translocating ATPase. *J.Bioenerg.Biomembr.* **39**:453-458.
99. **Lin, Y. F., J. Yang, and B. P. Rosen.** 2007. *ArsD* residues Cys12, Cys13, and Cys18 form an As(III)-binding site required for arsenic metallochaperone activity. *J.Biol.Chem.* **282**:16783-16791.
100. **Lin, Y. F., A. R. Walmsley, and B. P. Rosen.** 2006. An arsenic metallochaperone for an arsenic detoxification pump. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **103**:15617-15622.
101. **López-Maury, L., F. J. Florencio, and J. C. Reyes.** 2003. Arsenic sensing and resistance system in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J.Bacteriol.* **185**:5363-5371.
102. **Hervas, M., L. Lopez-Maury, P. Leon, A. M. Sanchez-Riego, F. J. Florencio, and J. A. Navarro.** 2012. *ArsH* from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 is an efficient NADPH-dependent quinone reductase. *Biochemistry.* **51**:1178-1187.
103. **López-Maury, L., A. M. Sanchez-Riego, J. C. Reyes, and F. J. Florencio.** 2009. The glutathione/glutaredoxin system is essential for arsenate reduction in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J.Bacteriol.* **191**:3534-3543.
104. **Li, R., J. D. Haile, and P. J. Kennelly.** 2003. An arsenate reductase from *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 exhibits a novel combination of catalytic characteristics. *J.Bacteriol.* **185**:6780-6789.
105. **Oremland, R. S., S. E. Hoefft, J. M. Santini, N. Bano, R. A. Hollibaugh, and J. T. Hollibaugh.** 2002. Anaerobic oxidation of arsenite in Mono Lake water and by a facultative, arsenite-oxidizing chemoautotroph, strain MLHE-1. *Appl.Environ.Microbiol.* **68**:4795-4802.
106. **Santini, J. M., L. I. Sly, R. D. Schnagl, and J. M. Macy.** 2000. A new chemolithoautotrophic arsenite-oxidizing bacterium isolated from a gold mine: phylogenetic, physiological, and preliminary biochemical studies. *Appl.Environ.Microbiol.* **66**:92-97.
107. **Santini, J. M. and R. N. vanden Hoven.** 2004. Molybdenum-containing arsenite oxidase of the chemolithoautotrophic arsenite oxidizer NT-26. *J.Bacteriol.* **186**:1614-1619.

108. **van den Hoven, R. N. and J. M. Santini.** 2004. Arsenite oxidation by the heterotroph *Hydrogenophaga* sp. str. NT-14: the arsenite oxidase and its physiological electron acceptor. *Biochim.Biophys.Acta.* **1656**:148-155.
109. **Lieutaud, A., L. R. van, S. Duval, L. Capowiez, D. Muller, R. Lebrun, S. Lignon, M. L. Fardeau, M. C. Lett, W. Nitschke, and B. Schoepp-Cothenet.** 2010. Arsenite oxidase from *Ralstonia* sp. 22: characterization of the enzyme and its interaction with soluble cytochromes. *J.Biol.Chem.* **285**:20433-20441.
110. **Macy, J. M., K. Nunan, K. D. Hagen, D. R. Dixon, P. J. Harbour, M. Cahill, and L. I. Sly.** 1996. *Chrysiogenes arsenatis* gen. nov., sp. nov., a new arsenate-respiring bacterium isolated from gold mine wastewater. *Int.J.Syst.Bacteriol.* **46**:1153-1157.
111. **Hoefl, S. E., T. R. Kulp, J. F. Stolz, J. T. Hollibaugh, and R. S. Oremland.** 2004. Dissimilatory arsenate reduction with sulfide as electron donor: experiments with mono lake water and Isolation of strain MLMS-1, a chemoautotrophic arsenate respirer. *Appl.Environ.Microbiol.* **70**:2741-2747.
112. **Hoefl, S. E., T. R. Kulp, S. Han, B. Lanoil, and R. S. Oremland.** 2010. Coupled arsenotrophy in a hot spring photosynthetic biofilm at Mono Lake, California. *Appl.Environ.Microbiol.* **76**:4633-4639.
113. **Oremland, R. S., T. R. Kulp, J. S. Blum, S. E. Hoefl, S. Baesman, L. G. Miller, and J. F. Stolz.** 2005. A microbial arsenic cycle in a salt-saturated, extreme environment. *Science.* **308**:1305-1308.
114. **Rippka, R. D. J. W. J. B. H. M. S. R. Y.** 1979. Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. *J.Gen.Microbiol.* **111**:1-61.
115. **Matsuoka, M., K. Takahama, and T. Ogawa.** 2001. Gene replacement in cyanobacteria mediated by a dominant streptomycin-sensitive *rps12* gene that allows selection of mutants free from drug resistance markers. *Microbiology.* **147**:2077-2087.
116. **Kufryk, G. I., M. Sachet, G. Schmetterer, and W. F. Vermaas.** 2002. Transformation of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 as a tool for genetic mapping: optimization of efficiency. *FEMS Microbiol.Lett.* **206**:215-219.
117. **Mohamed, A. and C. Jansson.** 1989. Influence of light on accumulation of photosynthesis-specific transcripts in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Plant Mol.Biol.* **13**:693-700.
118. **Komenda, J. and J. Barber.** 1995. Comparison of *psbO* and *psbH* deletion mutants of *Synechocystis* PCC 6803 indicates that degradation of D1 protein is regulated by the QB site and dependent on protein synthesis. *Biochemistry.* **34**:9625-9631.
119. **Hellman, L. M. and M. G. Fried.** 2007. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein-nucleic acid interactions. *Nat.Protoc.* **2**:1849-1861.
120. **Nakamura, Y., T. Kaneko, M. Hirosawa, N. Miyajima, and S. Tabata.** 1998. Cyanobase, a www database containing the complete nucleotide sequence of the genome of *Synechocystis* sp. strain PCC6803. *Nucleic Acids Res.* **26**:63-67.

121. **Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman.** 1990. Basic local alignment search tool. *J.Mol.Biol.* **215**:403-410.
122. **Ciria, R., C. Abreu-Goodger, E. Morett, and E. Merino.** 2004. GeConT: gene context analysis. *Bioinformatics.* **20**:2307-2308.
123. **Cole, C., J. D. Barber, and G. J. Barton.** 2008. The Jpred 3 secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Res.* **36**:W197-W201.
124. **Hirokawa, T., S. Boon-Chieng, and S. Mitaku.** 1998. SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics.* **14**:378-379.
125. **Bernsel, A., H. Viklund, A. Hennerdal, and A. Elofsson.** 2009. TOPCONS: consensus prediction of membrane protein topology. *Nucleic Acids Res.* **37**:W465-W468.
126. **Källberg, M., H. Wang, S. Wang, J. Peng, Z. Wang, H. Lu, and J. Xu.** 2012. Template-based protein structure modeling using the RaptorX web server. *Nat.Protoc.* **19**:1511-1522.
127. **Arnold, K., L. Bordoli, J. Kopp, and T. Schwede.** 2006. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics.* **22**:195-201.
128. **Bernstein, F. C., T. F. Koetzle, G. J. Williams, E. F. Meyer, Jr., M. D. Brice, J. R. Rodgers, O. Kennard, T. Shimanouchi, and M. Tasumi.** 1977. The Protein Data Bank: a computer-based archival file for macromolecular structures. *J.Mol.Biol.* **112**:535-542.
129. **Peca, L., P. B. Kos, and I. Vass.** 2007. Characterization of the activity of heavy metal-responsive promoters in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Acta Biol.Hung.* **58 Suppl**:11-22. doi: 10.1556/ABiol.58.2007.Suppl.2.:11-22.
130. **Shahak, Y., B. Arieli, B. Binder, and E. Padan.** 1987. Sulfide-dependent photosynthetic electron flow coupled to proton translocation in thylakoids of the cyanobacterium *Oscillatoria limnetica*. *Arch.Biochem.Biophys.* **259**:605-615.
131. **Kruk, J., H. Hollander-Czytko, W. Oettmeier, and A. Trebst.** 2005. Tocopherol as singlet oxygen scavenger in photosystem II. *J.Plant Physiol.* **162**:749-757.
132. **Schuurmans, R. M., J. M. Schuurmans, M. Bekker, J. C. Kromkamp, H. C. Matthijs, and K. J. Hellingwerf.** 2014. The redox potential of the plastoquinone pool of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 is under strict homeostatic control. *Plant Physiol.*
133. **Los, D. A., A. Zorina, M. Sinetova, S. Kryazhov, K. Mironov, and V. V. Zinchenko.** 2010. Stress sensors and signal transducers in cyanobacteria. *Sensors.(Basel).* **10**:2386-2415.
134. **Elias, M., A. Wellner, K. Goldin-Azulay, E. Chabriere, J. A. Vorholt, T. J. Erb, and D. S. Tawfik.** 2012. The molecular basis of phosphate discrimination in arsenate-rich environments. *Nature.* **491**:134-137.

135. **Kang, Y. S., J. Heinemann, B. Bothner, C. Rensing, and T. R. McDermott.** 2012. Integrated co-regulation of bacterial arsenic and phosphorus metabolisms. *Environ.Microbiol.* **14**:3097-3109.
136. **Thiel, T.** 1988. Phosphate transport and arsenate resistance in the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *J.Bacteriol.* **170**:1143-1147.
137. **Wolfe-Simon, F., B. J. Switzer, T. R. Kulp, G. W. Gordon, S. E. Hoefft, J. Pett-Ridge, J. F. Stolz, S. M. Webb, P. K. Weber, P. C. Davies, A. D. Anbar, and R. S. Oremland.** 2011. A bacterium that can grow by using arsenic instead of phosphorus. *Science.* **332**:1163-1166.
138. **Haren, L., B. Ton-Hoang, and M. Chandler.** 1999. Integrating DNA: transposases and retroviral integrases. *Annu.Rev.Microbiol.* **53**:245-81.:245-281.
139. **Nagy, Z. and M. Chandler.** 2004. Regulation of transposition in bacteria. *Res.Microbiol.* **155**:387-398.
140. **Mahillon, J. and M. Chandler.** 1998. Insertion sequences. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **62**:725-774.
141. **Cassier-Chauvat, C., M. Poncelet, and F. Chauvat.** 1997. Three insertion sequences from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803 support the occurrence of horizontal DNA transfer among bacteria. *Gene.* **195**:257-266.
142. **Grigorieva, G. and S. Shestakov.** 1982. Transformation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. 6803. *Fems Microbiol Lett* **13**:367-370.
143. **Zang, X., B. Liu, S. Liu, K. K. Arunakumara, and X. Zhang.** 2007. Optimum conditions for transformation of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J.Microbiol.* **45**:241-245.
144. **Marraccini, P., S. Bulteau, C. Cassier-Chauvat, P. Mermet-Bouvier, and F. Chauvat.** 1993. A conjugative plasmid vector for promoter analysis in several cyanobacteria of the genera *Synechococcus* and *Synechocystis*. *Plant Mol.Biol.* **23**:905-909.
145. **Krafft, T. and J. M. Macy.** 1998. Purification and characterization of the respiratory arsenate reductase of *Chrysiogenes arsenatis*. *Eur.J.Biochem.* **255**:647-653.
146. **Hollibaugh, J. T., C. Budinoff, R. A. Hollibaugh, B. Ransom, and N. Bano.** 2006. Sulfide oxidation coupled to arsenate reduction by a diverse microbial community in a soda lake. *Appl.Environ.Microbiol.* **72**:2043-2049.
147. **Oremland, R. S., S. E. Hoefft, J. M. Santini, N. Bano, R. A. Hollibaugh, and J. T. Hollibaugh.** 2002. Anaerobic oxidation of arsenite in Mono Lake water and by a facultative, arsenite-oxidizing chemoautotroph, strain MLHE-1. *Appl.Environ.Microbiol.* **68**:4795-4802.
148. **Fisher, J. C., D. Wallschlager, B. Planer-Friedrich, and J. T. Hollibaugh.** 2008. A new role for sulfur in arsenic cycling. *Environ.Sci.Technol.* **42**:81-85.
149. **Newman, D. K., E. K. Kennedy, J. D. Coates, D. Ahmann, D. J. Ellis, D. R. Lovley, and F. M. Morel.** 1997. Dissimilatory arsenate and sulfate reduction in *Desulfotomaculum auripigmentum* sp. nov. *Arch.Microbiol.* **168**:380-388.

150. **Newman, D. K., T. J. Beveridge, and F. Morel.** 1997. Precipitation of Arsenic Trisulfide by *Desulfotomaculum auripigmentum*. *Appl.Environ.Microbiol.* **63**:2022-2028.
151. **Richey, C., P. Chovanec, S. E. Hoefft, R. S. Oremland, P. Basu, and J. F. Stolz.** 2009. Respiratory arsenate reductase as a bidirectional enzyme. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **382**:298-302.

Összefoglalás

Annak ellenére, hogy a két környezeti szempontból ártalmatlan vegyület, a hidrogén-szulfid és az arzén biogeokémiai tulajdonságait alaposan tanulmányozták, csak feltételezések és közvetett bizonyítékok születtek ennek a két toxikus, de potenciálisan energiagazdag vegyületnek a biológiai kölcsönhatásaira.

Jelen munkánkban egy olyan operon kerül bemutatásra, ami genetikai és molekuláris szinten kapcsolatot mutat a szulfid és arzén alapú alternatív anyagcsereutak között a *Synechocystis* sp. PCC6803 cianobaktériumban.

A földi élet kialakulásának kezdete óta különböző redukált kén- és arzénvegyületek számos mikroorganizmus számára szolgálnak elektronforrásként anyagcsere folyamataikhoz. Azok a fotoautotróf szervezetek, amelyek hidrogén-szulfid bontásából állították elő az ATP szintézishez szükséges proton grádienszt egy szulfid-kinon oxidoreduktáz, köztes enzimek és PSI típusú fotokémiai rendszer segítségével valósították meg a fotofoszfórilációt. Más mikroorganizmusok, amelyek elektrondonorként arzenitet vagy elektronakceptorként arzenátokat hasznosítottak anyagcserefolyamataik fenntartásához, azok arzenit-oxidáz illetve arzenát-reduktáz enzimeket használtak.

Munkánkban bemutatjuk, hogy a *Synechocystis* 6803 cianobaktérium a genomjában olyan géneket hordoz, amelyek anaerob, szulfid és/vagy arzén alapú anyagcsereutakat kódolnak. Ezek a gének egy operont alkotnak és a következő nyitott leolvasási keretként vannak nyilvántartva a Cyanobase adatbázisban: sl15035, sl15036, slr5037 és slr5038. Mivel feltételeztük, hogy a gének szulfid oxidációval hozhatók kapcsolatba *suoR*, *suoS*, *suoC* és

suoT-nek neveztük őket. A *suoR* fehérje terméke nagyfokú homológiát mutat az ArsR fehérjecsald regulátoraival, amelyek baktériumok arzén rezisztencia génjeinek a kifejeződését szabályozzák. A *suoS* terméke aktív szulfid–kinon oxidoreduktázokkal mutat hasonlóságot. A *suoC* egy konzervált, de nem azonosított funkciójú géncsaláddal mutat közeli rokonságot. A *suoT* pedig annak ellenére, hogy egy kromát transzportert kódoló génként van nyilvántartva az adatbázisban, feltételezésünk szerint arzénszállításban játszhat szerepet.

A *suoRSCT* operon génjeinek expressziós vizsgálatával kimutattuk, hogy az operon aktív, mivel a gének specifikus induktorok hatására kifejeződnek. A vizsgált, potenciális vegyületek közül a *suo* operon génjei csak az arzén és kén redukált vegyületeire, a nátrium–arzenitre és a hidrogén–szulfidra, indukálódnak, azaz olyan vegyületekre, amelyek más mikroorganizmusok anyagcserefolyamataiban elektron donorként hasznosulnak.

A *SuoS* enzim vizsgálatából kiderült, hogy *SQR* aktivitása van: képes *in vivo* oxidálni a környezetben levő hidrogén–szulfidot és az így nyert elektronokkal a plasztokinon állományt redukálja. Azt is bizonyítottuk, hogy a *SuoS* enzim működésén alapuló anyagcsere a fény jelenlétéhez kötött, tehát a *Synechocystis* képes áttérni egy szulfid alapú „bakteriális típusú” alternatív fotoszintézisre.

Kimutattuk, hogy a *SuoS* *SQR* enzimet kódoló *suoRSCT* egy negatív szabályozás alatt álló indukálható operon, mivel a gének a *SuoR* represszornak gátlása alatt állnak induktor vegyületek hiányában. Azonban ez a represszor az ArsR fehérjék családjába tartozik, amelyek általában különböző baktériumok arzén–rezisztencia génjeinek a kifejeződését szabályozzák.

Bebizonyítottuk, hogy nincsen genetikai szintű kapcsolat a *Synechocystis arsBHC* génjei által kódolt arzén rezisztencia rendszer és a *suoRSCT* operonok szabályozása között. Ez érthető is, mivel csak az induktor közös a két operonban, funkciójuk eltér egymástól. A *suo* gének tehát nem arzén rezisztenciában vesznek részt.

Annak ellenére, hogy a *suoT* gén terméke kromát transzporterként van nyilvántartva, a gén nem indukálódik krómvegyületek jelenlétében. Kimutattuk azonban, hogy a *SuoT*-nek arzén felvételben van szerepe, ami olyan anaerob körülmények között élő mikroorganizmusokra jellemző, amelyek a redukált arzénvegyületeket elektron donorként vagy az oxidált arzénvegyületeket elektron akceptorként használják életfolyamataikhoz.

Kimutattuk továbbá, hogy a *suoRSCT* operon környezete olyan DNS régiókat tartalmaz, amelyek IS4 típusú mozgékony genetikai elemekre jellemzőek. Mivel a mikroorganizmusok között a horizontális géntranszfer igen gyakori, feltehetőleg a *Synechocystis suo* operonja is egy olyan mikroorganizmustól származhatott, amely szulfiddal és/vagy arzénnel telített anaerob környezetből származott. A *suo* operon jelenléte és működőképessége annak bizonyítéka, hogy evolúciós előnyt biztosíthatott a *Synechocystis* számára szélsőséges módon változó környezeti feltételek között.

Mindamellet, hogy a *Synechocystis*re, mint általában a cianobaktériumokra a „növényi típusú” fotoszintézis jellemző, anaerob körülmények között szulfid jelenlétében, képes áttérni egy evolúciós szempontból ősi, „bakteriális típusú” fotoszintetikus anyagcserére.

Munkánk eredményei újdonságnak számítanak, ugyanis rávilágítanak arra, hogy a két, evolúciós szempontból ősi anyagcsereút között genetikai és molekuláris szintű közvetlen összefüggés lehetséges. Korábban is születtek elméletek a két anyagcsereút kapcsoltságáról, annak érdekében, hogy különböző szulfid-függő arzén-detoxifikációs mechanizmusok fenotípusát megmagyarázzák, de ezeket eddig genetikai vagy molekuláris szinten még nem bizonyították.

Az oxigént termelő baktériumban ennek a szigorúan anaerob SuoS SQR enzimnek a jelenléte és a két anyagcsereút kapcsolata új megvilágításba helyezi a cianobaktériumok evolúcióját, genetikai plaszticitását és esetleges gyakorlati felhasználásukat.

Summary

Although the biogeochemistry of the two environmentally hazardous compounds arsenic and sulfide has been extensively investigated, the biological interference of these two toxic but potentially energy-rich compounds has only been hypothesized and indirectly proven.

Here we provide direct evidence for the first time that in the photosynthetic model organism *Synechocystis* the two metabolic pathways are linked by co-regulated genes that are involved in arsenic transport, sulfide oxidation and in sulfide-based alternative photosynthesis.

Since the beginnings of life on Earth the reduced forms of several chemical elements like sulfur or arsenic were serving as electron source for different prokaryotes to sustain their metabolism and energy need. Those phototrophic organisms which were relying on sulfide to meet their ATP need were using a sulfide-quinone oxidoreductase (SQR), intermediate enzymes and PSI-type photosynthetic system. Other microorganisms, that utilized arsenite as electron donor or arsenate as electron acceptors, were using arsenite oxidase and arsenate reductase enzymes respectively to sustain their growth requirements.

Sulfide-quinone oxidoreductases are specific for several green and purple sulfur and non-sulfur bacteria, thus the discovery by Cohen *et al.* in the 1970s that some cyanobacteria can turn to an ancient bacterial-type photosynthesis using sulfide-quinone oxidoreductases was rather exceptional. Since then it has been shown, that SQR enzymes are spread in most living organisms. The same is true for arsenite oxidases: the finding that several proteobacteria can use arsenic via arsenite oxidases was considered an extraordinary discovery but further investigations were pointing out, that these are actually ancient, pre-LUCA enzymes.

We discovered that in the genome of *Synechocystis* an operon is present that contains several genes, which may be involved in anaerobic photosynthesis/metabolism based on sulfide and/or arsenic as energy source. This operon is localized on the pSYSM plasmid and contains the following genes according to Cyanobase: sll5035, sll5036, slr5037 and slr5038. Because sll5036 encodes an SQR enzyme we presumed, that the genes are involved in **sulfide oxidation**, therefore we designated them as *suoR*, *souS*, *suoC* and *suoT* respectively. The protein product of *suoR* shows high homology with bacterial transcriptional regulatory proteins of the ArsR family that are normally involved in arsenic resistance. *SuoS* is annotated as a sulfide-quinone oxidoreductase that may provide electrons from hydrogen sulfide into the photosynthetic electron transport chain serving as an alternative photosynthetic pathway. The *suoC* gene is a highly conserved gene as well and belongs to the DUF302 superfamily, although without an assigned function. The *suoT* gene shows high homology with transmembrane proteins involved in heavy metal export/transport and is annotated as a chromate transporter. Because usually cyanobacteria do not thrive in anaerobic sulfidic habitats and do not rely on sulfide or arsenite as energy source for their growth, we aimed to investigate the functionality, role and origin of these genes.

By analyzing the expression of the *suoS* and *suoT* genes, we demonstrated that the *suoRSCT* operon is active, since the genes exhibit an approximately 200 fold induction in the presence of specific inductors. The operon responds only to the reduced forms of sulfur and arsenic not the oxidized forms and neither to a series of heavy metals studied. Both hydrogen sulfide and arsenite are used as electron donors by different prokaryotes.

We proved that *SuoS* is an active type-I SQR: the oxidative half reaction of *SuoS* has been determined by gas chromatography while the reductive half reaction by anaerobic

spectrophotometry. Besides this we showed that SuoS is only functional in the presence of light, thus its function is to provide electrons from sulfide into the photosynthetic electron transport *via* the plastoquinone pool.

The *suo* operon is a negatively controlled inducible operon regulated by the SuoR repressor. However it is an interesting fact that an SQR enzyme is regulated by an ArsR-type protein normally involved in arsenic resistance. We performed an EMSA experiment in order to gain a more direct evidence of the arsenic dependent regulation of the operon. We proved that under normal circumstances the operon is repressed by SuoR and we could also demonstrate the arsenite dependent de-repression of the *suo* genes. Thus we conclude that the product of the *suoR* gene encodes an arsenite dependent repressor of the *suoRSCT* operon. This protein binds to the promoter region, repressing the operon whereas it dissociates in the presence of As(III) allowing the expression of the genes.

Since ArsR, the regulator of the well described arsenic resistance operon (*arsBHC*) of *Synechocystis* and SuoR belong to the same protein family, we tested the affinity of SuoR towards the promoter sequence of the *arsBHC* operon via an EMSA experiment. We showed that SuoR has no affinity toward the promoter sequence of *arsBHC* but binds solely its specific *suoRSCT* promoter region, hence the *suoRSCT* operon is not playing role in arsenic resistance.

Although SuoT is annotated as a chromate transporter it does not responds to chromate compounds, rather to arsenite. Furthermore according to our inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) measurements SuoT is a transporter protein implicated in arsenite uptake. Although arsenite is not used as an energy source under natural oxygenic photosynthetic conditions, this importer is still functional. This type of arsenic uptake system

is characteristic presumably for microorganisms, that thrive in arsenic-rich habitats and which are able to use arsenite as electron donor or arsenate as electron acceptor for their metabolism.

The DNA region of the *suoRSCT* operon shows the characteristic structure of transposable genetic elements of type IS4. We identified a gene encoding a transposase downstream of *suoT* with conserved domain structures characteristic to the DDE superfamily transposases. We also found a pair of 20 bp imperfect inverted repeats delimiting the *suo* operon. Because *Synechocystis* is naturally competent for transformation and conjugation and the presence of 128 putative transposase sequences in *Synechocystis* strongly suggests that this organism has been involved in horizontal gene transfer. Thus we conclude that this operon was acquired *via* horizontal gene transfer originated from microorganisms thriving in sulfide/arsenic-rich habitats.

Synechocystis may have benefits conveyed by these functional genes. Geochemical events like volcanic eruptions or other cataclysms may result in temporal exposure to both arsenic and sulfide. As sulfide inhibits the activity of PSII, the SQR enzyme may provide advantages, either providing electrons to the photosynthetic electron transport chain or converting sulfide to less toxic substances.

Under normal conditions *Synechocystis* uses water as the electron donor for photosynthesis, so these genes may represent the remnants of an ancient metabolism or a feature acquired from some bacteria with no functional PSII, and they may have retained their activities due to their utility in sulfide and arsenite detoxification. The functionality of the *suo* genes indicates the presence of some selection pressure even in recent times and points to the possibility that when it grows in nature *Synechocystis* can experience environmental conditions under which the function of the *suo* operon is beneficial.

Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek, Dr. Vass Imrének, hogy lehetőséget adott és folyamatos támogatást biztosított, hogy a kutatócsoportjában dolgozhassak, tanulhassak és számos szakmai tapasztalatot szerezhsek; hogy támogatta tudományos konferenciákon való részvételemet, melyek pótolhatatlan értékeket nyújtottak; hálás vagyok türelmes, minden munkámra kiterjedő aprólékos, részletbemenő felülvizsgálatáért és objektív bírálatáért.

Hálás vagyok Dr. Kós Péter témavezetőmnek szakmai és minden egyéb téren nyújtott segítségéért, pártfogásáért, közvetlenségéért, barátságáért, bizalmáért. Köszönöm neki, hogy számtalan gyakorlati és elméleti, technikai és szakmai ismeretre tehettem szert szakírányítása alatt; hogy folyamatosan támogatott munkámban és hogy mindig számíthattam a segítségére, útmutatására.

Köszönettel tartozom a kutatócsoportunk minden tagjának. Köszönet Dr. Deák Zsuzsának, Dr. Kiss Évának, Dr. Loredana Pecanak, nemsokára-Dr. Vass István Zoltánnak segítségükért, kedvességükért.

Külön köszönet illeti kedves laboránsunkat Fleit Gabriellát, akinek a segítsége nélkül megkétszereződne az amúgy sem kevés kutatómunkánk.

Köszönöm Dr. Kis Mihály technikai kérdésekben nyújtott segítségét.

Nagyon sok hálával tartozom a Szegedi Tudományegyetem TTK Biotechnológiai Tanszék tagjainak: Dr. Rákhely Gábornak szakmai tanácsaiért, útmutatásáért, valamint, hogy lehetővé tette, hogy kutatócsoportjában dolgozhassak. Dr. Tóth Andrásnak, Duzs Ágnesnek és Tengölics Rolandnak is szeretném megköszönni szakmai segítségüket és kedves barátságukat.

Köszönet Dr. Ördög Attilának munkám eredményeihez való hozzájárulásáért.

Örömömmre szolgál ezzel az alkalommal hálámat kifejezni kedves szüleimnek és drága hugomnak a sok bátorításért és a számtalan formában nyújtott segítségért.

Végezetül pedig, köszönöm barátaimnak, hogy jelenlétük és támogatásuk nagy segítséget jelentett számomra a doktori évek megpróbáltatásai alatt.

