

# **A HupSL és Hox1 NiFe hidrogenáz enzimek összehangolt szabályozásának vizsgálata *Thiocapsa roseopersicina* baktériumban**

Ph.D. értekezés

Nagy Ildikó Katalin

Biológia Doktori Iskola

Témavezetők:

Dr. Maróti Gergely

Dr. Rákhely Gábor

Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Biokémiai Intézet  
Szegedi Tudományegyetem Biotechnológiai Tanszék

Szeged

2016.

# TARTALOMJEGYZÉK

I. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	3
II. BEVEZETÉS .....	4
III. IRODALMI ÁTTEKINTÉS .....	7
1. Hidrogenáz enzimek általános jellemzése, csoportosítása.....	7
1.1. Hidrogenázok felépítés szerinti csoportosítása .....	8
1.2 Hidrogenázok csoportosítása funkció alapján .....	10
1.3. Hidrogenázok expressziójának szabályozása .....	12
1.4. A NiFe hidrogenázok bioszintézise.....	15
2. <i>Thiocapsa roseopersicina</i> BBS.....	17
2.1. <i>Thiocapsa roseopersicina</i> hidrogenázai és szabályozásuk.....	17
3. <i>Ralstonia eutropha</i> és hidrogenáz enzimek .....	24
IV. CÉLKITŰZÉSEK.....	26
V. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK .....	28
1. Baktériumtörzsek és plazmidok .....	28
2. Baktériumok tenyésztése.....	30
3. Konjugáció .....	31
4. Tioszulfát koncentrációjának meghatározása .....	32
5. DNS manipulációs munkák.....	32
6. Kémiai kompetens sejt készítés .....	34
7. Kémiai transzformálás .....	34
8. Különböző hidrogenáz mutánsok elkészítése .....	35
9. RNS-sel végzett munkák.....	37
10. Transzkriptom analízis .....	39
11. Sejtek feltárása szonikálással .....	39
12. Hidrogenáz aktivitásmérések .....	40
13. Fehérjékkel végzett munkák .....	41

VI. EREDMÉNYEK.....	43
1. Az újonnan azonosított HupO a HupSL negatív regulátora.....	43
1. 1. HupSL hidrogenáz tioszulfát függő <i>in vivo</i> aktivitása .....	43
1.2. Korábban ismeretlen <i>hupO</i> gén azonosítása a <i>hupSL</i> génklaszterben.....	45
1.3. A HupSL megnövekedett aktivitása és expressziója a $\Delta hupO$ törzsben (HOD13) .....	47
1.4. A <i>hupO</i> gén transzkripció szintjének meghatározása .....	52
1.5. Hidrogénfüggő HupSL expresszió a $\Delta hupO$ (HOD13) törzsben .....	53
2. Heterológ HoxI fehérje hatása a Hox1 hidrogenázra .....	56
2. 1. HoxI fehérje heterológ expressziója <i>T. roseopersicina</i> -ban.....	56
2. 2. HoxI hatása az <i>in vivo</i> Hox1 általi hidrogéntermelésre .....	57
2. 3. Teljes transzkriptom analízis .....	58
VII. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA .....	62
1. HupO regulátor szerepe a HupSL hidrogenáz működésében .....	62
2. A HoxI heterológ fehérje hatása a Hox1 hidrogenázra .....	65
VIII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....	68
IX. IRODALOMJEGYZÉK .....	69
X. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE .....	82
XI. ÖSSZEFOGLALÁS .....	84
XII. SUMMARY .....	87
XIII. NYILATKOZAT .....	90

## I. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

cDNS: komplementer dezoxiribonukleinsav

DNS: dezoxiribonukleinsav

dNTP: dezoxinukleozid-trifoszfát

EDTA: etilén-diamin tetraecetsav

Er: eritromicin

FNR: fumarát nitrát reduktáz enzim

g: nehézségi gyorsulás

Gm: gentamicin

H<sub>2</sub>: hidrogén (molekuláris)

kDa: kilodalton (atomi tömeg egység)

Km: kanamicin

LB: Luria-Bertani tápoldat

mtsai: munkatársai

N<sub>2</sub>: nitrogén (molekuláris)

NAD: nikotinamid-adenin-dinukleotid

NADP: nikotinamid-adenin-dinukleotid foszfát

NCBI: National Center for Biotechnology Information, nemzetközi adatbázis

OD: optikai denzitás

orf: open reading frame, nyitott leolvasási keret

PCR: polimeráz láncreakció

PHA: polihidroxi-alkánsav

RNáz A: ribonukleáz A enzim

RNS: ribonukleinsav

RT-qPCR: reverz transzkripció kapcsolt kvantitatív polimeráz láncreakció

SDS: nátrium-dodecil szulfát

SDS-PAGE: denaturáló poliakrilamid gélelektroforézis

SOB: super optimal broth (tápanyagokban gazdag tápoldat)

Sm: sztreptomycin

Tris: Trisz-(hidroximetil)-aminometán

## II. BEVEZETÉS

Napjaink technológiai elsősorban a fosszilis energiahordozók (földgáz, kőolaj, szén) alkalmazására épülnek, ezek keletkezése viszont sokkal lassabb, mint felhasználásuk sebessége. A szénalapú energiaforrásaink végesek, mindemellett a rendelkezésünkre álló készletek kiaknázása és alkalmazása rendkívül környezetszennyező. A fosszilis energiaforrásaink kitermelése és használata során nagy mennyiségű, üvegházhatást okozó gázok – többek között metán, szén-dioxid, klórozott szénhidrogének és nitrogén-oxidok – szabadulnak fel és kerülnek a légterbe (Pimentel 1991), aminek következményeként már napjainkban is tapasztalható a globális felmelegedés, Földünk klímájának folyamatos változása.

Mindez alternatív, tiszta és megújuló energiaforrások kutatására sarkall bennünket, még akkor is, ha a jelenlegi szénhidrogén készleteink még néhány évtizedre elegendőek. Egy új energiahordozóval szemben támasztott követelmények a következőek: legyen környezetbarát, olcsó, nagy mennyiségben elérhető és biztonságosan tárolható. A legkézenfekvőbb és legnagyobb természetes energiaforrás a Nap, amit a jövőben egyre nagyobb hatásokkal aknázhatunk ki.

A napenergia fizikai módszerekkel történő felhasználása már napjainkban is jól működő, egyre szélesebb körben alkalmazott eljárás. Megkülönböztethetünk fotovillamos naperőműveket, valamint naphőerőműveket. A fotovillamos naperőmű a Nap elektromágneses sugárzását alakítja villamos árammá napelemeket alkalmazva, míg a naphőerőmű napkollektorok segítségével a Nap infravörös energiáját gőzfejlesztésre használja és turbinákkal elektromos árammá alakítja. A napelemek, napkollektorok alkalmazása jelenleg még magas telepítési és üzembehelyezési költségekkel jár, ezért sok esetben nem tudják felvenni a versenyt a fosszilis energiahordozókkal. A naperőművek telepítése hosszú távon megtérülő befektetés, mivel ezek a rendszerek rendkívül alacsony költséggel képesek energia előállítására, így mindenféleképpen a jövőbeli energia-előállítás egyik potenciális formája a fosszilis energiával szemben.

A napenergia hidrogénné alakítható, akár biológiai úton is. A hidrogén ( $H_2$ ) a legegyszerűbb kémiai elem, amely sok szempontból megfelelő megújuló energiaforrásként szolgálhat, hiszen nem üvegházhatású, nem toxikus, nem rákkeltő, nem radioaktív és a környezetbe történő kijuttatása sem okoz környezetszennyezést, elégetése során keletkező

egyetlen melléktermék a víz. Molekuláris hidrogén előállítható kémiai reakciókkal, valamint különböző biológiai folyamatok segítségével, mint a víz biofotolízise algákkal és cianobaktériumokkal, szerves vegyületek sötét fermentációja anaerob baktériumokkal, fotofermentáció fotoszintetikus baktériumokkal és végül olyan kétlépcsős rendszerrel, amely a sötét- és fotofermentáció kombinációja.

Kizárólag alacsonyabb rendű élőlények (archaeák, baktériumok és eukarióta algák) rendelkeznek olyan ősi enzimekkel, melyek képesek hidrogén fejlesztésére protonok és elektronok felhasználásával. Ezek a nitrogenáz és hidrogenáz enzimek. A nitrogenázok kizárólag Baktériumokban és Archeákban megtalálható enzimek (Young 1992). Képesek a légköri, kémiaiilag semleges nitrogénből ammóniumot előállítani, mely a növények számára hasznosítható nitrogénforrás. A nitrogén-fixálás során melléktermékként jelentős mennyiségű molekuláris hidrogén keletkezik (Burgess és mtsai., 1996).

A fotoheterotróf  $H_2$  termelést (fotofermentáció) az anaerob körülmények között élő fotoszintetizáló baktériumok (pl. *Rhodobacter sp.*, *Rhodospseudomonas sp.*) végzik napfény és szerves szubsztrátok felhasználásával. A biofotolízissel ellentétben ezen folyamatok során nem képződik oxigén, amely gátló tényezőnek számítana. Ezen élőlények hidrogenáz és nitrogenáz enzimekkel egyaránt rendelkeznek, azonban a jelentős mennyiségű hidrogéntermelés elsősorban a nitrogenáz enzimekhez köthető. Hidrogenázaik elsődleges feladata a nitrogenáz által termelt hidrogén visszavétele, annak oxidálása, ezáltal jelentősen növelve a fotoheterotróf  $H_2$  termelés hatékonyságát. A fotofermentáció esetében is számolnunk kell gátló tényezőkkel, mint például az ammónium ionok ( $NH_4^+$ ), melyek a nitrogenáz enzim expresszióját gátolják. A végső energiamérleget a nitrogenázokhoz kapcsolódó reakciók viszonylag nagy energiaigénye is rontja (Oh és mtsai., 2011).

Biológiai hidrogéntermelés lehetséges a víz biofotolízisével is, amelyre cianobaktériumok és zöldalgák képesek hidrogenáz enzimeik révén. A folyamathoz csupán víz és napfény szükséges, a képződő elektronok a sejtekben a redox koenzimeket redukálják, melyeket utána a hidrogenáz enzimek oxidálnak, miközben az elektronokat hidrogén termelésével juttatják ki a sejtekből. A biofotolízis alapú  $H_2$  termelő folyamatok mérsékelt hatékonyságúak, mivel az aerob fotoszintézis során keletkező oxigén a legtöbb hidrogenáz működését gátolja, valamint a fotokémiai hatékonyság is meglehetősen alacsony.

A biológiai hidrogéntermelés harmadik lehetősége a fakultatív vagy obligát anaerob baktériumok (pl. *Escherichia coli*, *Clostridium sp.*) által végzett sötét fermentáció, melyhez

ezen organizmusok a szerves anyagok (akár szerves hulladékok) széles körét képesek felhasználni szén-, energia- és elektronforrásként. Bár a folyamat során az előbbiekhöz képest több hidrogén termelődik, a keletkező szerves melléktermékek (többek között acetát, propionát, butirát, laktát, aceton, butanol és etanol) miatt az ipari hasznosításhoz a sötét fermentációhoz kapcsolódó hidrogéntermelő folyamatok is finomításra szorulnak (Kim és mtsai., 2011; Oh és mtsai., 2011).

A hidrogenázok hasznosak lehetnek, mint a tiszta energiahordozó termelői (*in vivo* és *in vitro* egyaránt), illetve helyettesíthetik az üzemanyagcellákban a platina alapú elektródokat a hidrogén bontása során. Az enzimeket immobilizálva enzim elektródként használhatóak. Akár egész sejtes rendszerek is használhatóak a mikrobiális energiacellák anód oldalán elektrontermelésre, természetes szubsztrátokat vagy például hidrogént használva elektronforrásként.

Az enzim alapú technológia legfőbb akadályja ma az enzimek alacsony stabilitása, annak ellenére, hogy számos módszer fejlesztés alatt áll a fehérjék immobilizálására és stabilizálására. A molekuláris biológia gyors fejlődése egyre több eszközt kínál az enzimek módosítására, fejlesztésére és a tulajdonságaik alakítására a szándékainknak megfelelően. Biztonságos, stabil, sokoldalú és megbízható hidrogenáz alapú biológiai rendszerek létrehozása valós lehetőség.

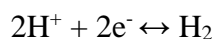
Annak érdekében, hogy környezetbarát és gazdaságos módon tudjunk mikroorganizmusokkal vagy a belőlük izolált enzimekkel kontrollált módon hidrogént előállítani vagy bontani, meg kell ismernünk a működésükhöz szükséges optimális körülményeket, az enzimek pontos szerkezetét, bioszintézisét, metabolikus kapcsolatait és a kódoló gének expressziójának szabályozását.

### III. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

#### 1. Hidrogenáz enzimek általános jellemzése, csoportosítása

A természetben számos mikroorganizmus képes hidrogént energiaforrásként hasznosítani, illetve a sejtben felhalmozódó elektronokat  $H_2$  formájában kijuttatni. A molekuláris hidrogén előállítását hidrogenáz és nitrogenáz enzimek katalizálják. Az Archeákban és Baktériumokban előforduló nitrogenázok kulcsfontosságú szerepet töltenek be a nitrogénfixálásban. A kémiaiilag semleges légköri nitrogént ( $N_2$ ) az élőlények számára hasznosítható ammóniummá redukálják miközben melléktermékként jelentős mennyiségű hidrogén keletkezik (Burgess és mtsai., 1996; Howard és mtsai., 1996).

Az ősi hidrogenáz enzimek változatos anyagcsere-kapcsolatokkal és enzimológiai jellemzőkkel rendelkeznek. Az első hidrogenázokat Archea és Baktérium fajokból izolálták az 1970-es években (Adams és mtsai., 1980; Graf és mtsai., 1981). Későbbi kutatások során prokarióták mellett egysejtű eukariótákban is azonosítottak hidrogenáz enzimeket, mint például a protozoák hidrogenozómájában (PageSharp és mtsai., 1996), valamint egysejtű zöldalgák (*Chlamydomonas reinhardtii*) kloroplasztiszában (Bui és mtsai., 1996; Happe és mtsai., 2002). A hidrogenázok által katalizált folyamat lényege a hidrogén oxidációja, valamint a protonok redukciója a következő egyenlet szerint (Vignais és mtsai., 2007):



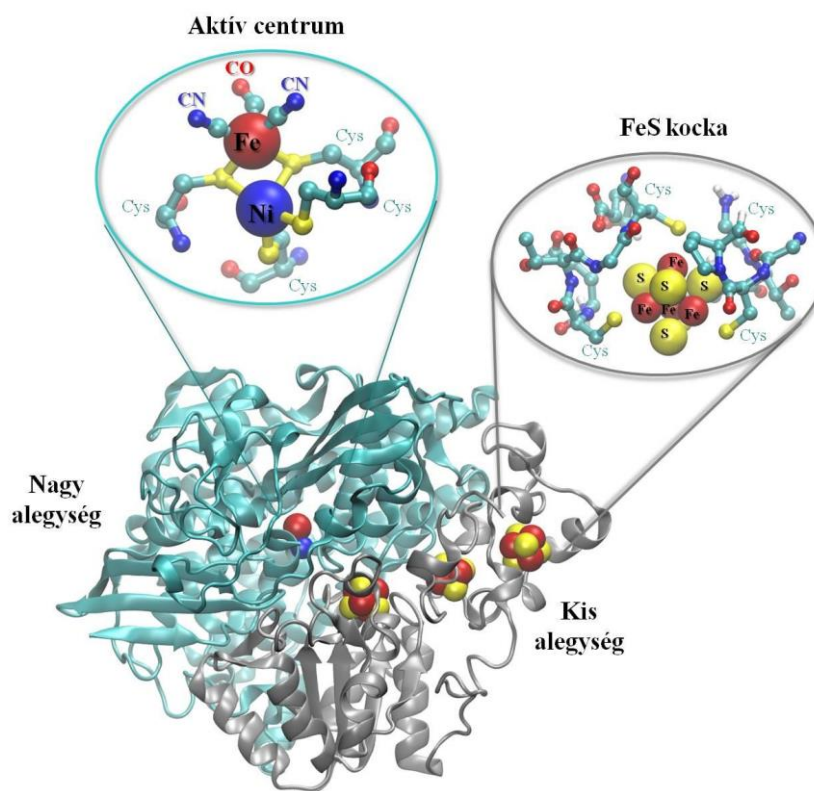
Ezen folyamat véghezviteléhez összetett szerkezetű enzimre van szükség, amely egy összetett folyamat révén jön létre. A hidrogenázt alkotó fehérjék polipeptidláncának szintézise önmagában nem eredményez aktív fehérjét, többlépcsős poszttranszlációs érési folyamat szükséges az érett enzim kialakulásához. A bioszintézishez számos kisegítő fehérje összehangolt munkája szükséges (Casalot és mtsai., 2001).



### 1.1. Hidrogenázok felépítés szerinti csoportosítása

Felépítésbeli különbség figyelhető meg a hidrogenázok aktív centrumának fémtartalmában. (Vignais és mtsai., 2007).

NiFe-hidrogenázok alkotják a hidrogenázok legnépesebb, széles körben kutatott, ezáltal leginkább ismert csoportját. Különböző anyagcsererendszerrel rendelkező mikroorganizmusokban található NiFe hidrogenáz, többek közt ilyen enzimet azonosítottak szulfát redukáló, kemolitotróf, kemoheterotróf, metanogén vagy fototróf baktériumokban (Cammack 2001). Az enzim egy  $\alpha$  és egy  $\beta$  alegységből felépülő heterodimer, a két alegység viszonylag nagy felületen érintkezik egymással. A nagyjából 60 kDa-os  $\alpha$  nagy alegységben található a két fématomot tartalmazó katalitikus centrum. A  $\beta$  kis alegység kb. 30 kDa méretű fehérje, itt található az elektrontranszportért felelős három FeS (vas-kén) kocka (Vignais és mtsai., 2007). A nagy alegység belsejében található fématomok koordinálásában négy cisztein vesz részt. A vas atomhoz továbbá kapcsolódik egy CO és két CN ligand is (Happe és mtsai., 1997; Pierik és mtsai., 1999; Volbeda és mtsai., 2002) (1. ábra). Az enzim működése során a molekuláris hidrogén hidrofób csatornákon keresztül közlekedik, az elektronok a FeS kockák segítségével jutnak el a redox partnerekhez. A protonok számára számos alternatív csatorna ismert (Dementin és mtsai., 2004; Szőri-Dorogházi és mtsai., 2012). Egyes NiFe hidrogenázok szelenocisztein formájában szelént tartalmaznak. *Desulfovibrio vulgaris* faj Miyazaki F törzsében kétirányú NiFeSe hidrogenázt azonosítottak (Nonaka és mtsai., 2013).



**1. ábra: A NiFe hidrogenázok térszerkezete.**

A nagy alegység zölddel, a kis alegység szürkével van jelölve. Az aktív centrum felépítése és a FeS kockák elrendeződése kinagyítva látható. (Szőri-Dorogházi és mtsai., 2012)

FeFe-hidrogenázt obligát anaerob prokariótákban és néhány anaerob eukariótában azonosítottak. Főként a  $H_2$  termelésben játszanak szerepet (Vignais és mtsai., 2001). A hidrogenáz nagy alegysége tartalmazza a katalitikus helyet, valamint három FeS kockát (Adams 1990). Fe-hidrogenáz található a *Clostridium pasteurianum* citoplazmájában (Peters 1999), valamint a *Desulfovibrio desulfuricans* periplazmájában (Nicolet és mtsai., 1999).

Fémmentes aktív centrummal rendelkező hidrogenáz metanogénekben található, az  $N^5, N^{10}$ -metenil-tetrahidrometanopterin  $H_2$ -nel történő reverzibilis reakcióját katalizáló enzim (Hartmann és mtsai., 1996). Az elektrontranszport ezen hidrogenázoknál is a FeS kockákon keresztül történik. Csak nikkel-mentes környezetben aktiválódik a sejtben, fontos szerepet játszik a nikkel-mentes közegben történő metanogenezisben (Afting és mtsai., 1998; Zirngibl és mtsai., 1992). Először *Methanobacter marburgensis*-ben írtak le fémmentes hidrogenázt. (Zirngibl és mtsai., 1992)

## 1.2 Hidrogenázok csoportosítása funkció alapján

Fiziológiai funkció alapján a hidrogenázokat négy csoportba különíthetjük el (Cammack 2001).

A H<sub>2</sub> felvevő hidrogenázok elsődleges feladata az energianyerés, a sejt energia-egyensúlyának folyamatos fenntartása. Ezek membránköthetők, illetve periplazmatikus hidrogenázok, mert a sejten kívülről veszik fel a hidrogént, így szükségük van membránhoz kapcsolt alegységekre. Oxidálják a hidrogént anaerob elektronakceptorok redukciójával anaerob respiráció és fotoszintetikus CO<sub>2</sub> redukció során, illetve aerob légzésnél az oxigén redukciójával. Az első lépésben a hidrogénből nyert elektronok citokróm b típusú transzmembrán fehérjén keresztül a kinon raktárba kerülve kapcsolódnak a légzési lánchoz. A redukált kinonból az elektronok terminális elektronakceptorokra kerülnek, így a sejt az energiát ATP formájában képes tárolni (Vignais és mtsai., 2007). Az enzimek szerkezetére jellemző, hogy kis alegységük N-terminális oldalán hosszú szignál peptiddel rendelkeznek, amelyet a Tat (twin-arginin translocation) transzport útvonalhoz tartozó fehérjék ismernek fel. A Tat rendszer a végleges szerkezetét elnyert enzimet kijuttatja a membránon keresztül a periplazmába (Sargent és mtsai., 2006). Számos Proteobaktérium, mint a *Bradyrhizobium japonicum* (Sayavedrasoto és mtsai., 1988) és a *Rhodobacter capsulatus* (Leclerc és mtsai., 1988) rendelkezik periplazmatikus vagy membránkapcsolt hidrogén visszavevő NiFe(Se) hidrogenázzal. Ezek az enzimek két alegységből épülnek fel, a nagy ( $\alpha$ ) alegység tartalmazza a NiFe centrumot, míg a kis ( $\beta$ ) alegység a [Fe-S] kockákat. Egyes cianobaktériumok - *Anabaena variabilis* - heterocisztájában NiFe-tilakoid membránhoz kapcsolódó, H<sub>2</sub> felvevő hidrogenázt azonosítottak (Schmitz és mtsai., 1995), amely aktiválódása kapcsolódik a nitrogénáz enzimrendszer működéséhez (Happe és mtsai., 2000). A bizonyos nitrogénfixáló baktériumok (pl. *Rhizobium leguminosarum*) is rendelkeznek hidrogénfelvevő NiFe hidrogenázzal, mely képes visszapumpálni a sejtbe a nitrogénáz enzim által melléktermékként termelt molekuláris hidrogént, ezáltal részben vissza tudja nyerni a nitrogén megkötése során felhasznált tetemes energiát.

A H<sub>2</sub> termelő hidrogenáz enzimek a sejt redox egyensúlyának fenntartása érdekében a H<sup>+</sup> redukciójával állítják elő a molekuláris hidrogént. A sejt elektrontöbbletét H<sub>2</sub> formájában raktározzák, majd pumpálják ki a környezetükbe. Az *Anabaena cylindrica* két szolubilis hidrogéntermelő hidrogenázzal rendelkezik (Ewart és mtsai., 1989). Az *Escherichia coli* és a *Rhodospirillum rubrum* hidrogéntermelő hidrogenázainak működése szorosan

összekapcsolt a C1-es komponensek (például CO és hangyasav) anaerob oxidációjával, a H<sub>2</sub> termelésével a sejtek megszabadulnak a folyamatban keletkező felesleges redukáló ekvivalensektől (Böhm és mtsai., 1990; Fox és mtsai., 1996).

A kétirányú hidrogenázok H<sub>2</sub> felvételre és termelésre egyaránt képes enzimek a sejt energetikai viszonyainak megfelelően preferálják a nukleotid típusú kofaktorok (NAD, NADP, F<sub>420</sub>) redukáló vagy oxidáló formáit. Általában rendelkeznek egy nagy és egy kis hidrogenáz alegységgel, valamint több, a fent említett kofaktorok megkötéséért felelős egységgel. Számos cianobaktériumban, mint például az *Anacystis nidulans*-ban található citoplazmatikus Hox-típusú reverzibilis hidrogenáz (Boison és mtsai., 1998). A szulfát redukáló *Desulfovibrio vulgaris* periplazmájában (Voordouw és mtsai., 1985), míg a szacharolitikus *Clostridium pasteurianum* citoplazmájában azonosítottak kétirányú hidrogenáz enzimet (Meyer és mtsai., 1991). Néhány hipertermofil Archaeában szintén azonosítottak kétirányú hidrogenáz enzimeket, ilyenek a *Thermococcus litoralis*-ban (Rákhely és mtsai., 1999), valamint a *Pyrococcus furiosus*-ban található NADPH oxidáló reverzibilis hidrogenázok, amelyek redukált kofaktorokból a sejt számára mellékterméket jelentő hidrogént állítanak elő (Nicolet és mtsai., 1999).

A Hox-típusú reverzibilis hidrogenázok négy, öt, valamint hat alegységes változatát azonosították különböző mikroorganizmusokban. Négy alegységes Hox hidrogenázok jellemzően nem fotoszintetizáló baktériumokban találhatóak, ahol a HoxFU diaforáz és a HoxYH hidrogenáz alegységekből épül fel az enzimkomplex. Ilyen hidrogenáz található *Rhodococcus opacus*-ban (Grzeszik és mtsai., 1997), *Methylococcus capsulatus*-ban (Hanczár és mtsai., 2002) és ilyen típusú enzim a *Thiocapsa roseopersicina* két Hox hidrogenáz enzime közül az egyik (Hox2, lásd alább) (Maróti és mtsai., 2010). Öt alegységes Hox típusú hidrogenáz található számos fotoszintetizáló baktériumban, ahol az ötödik alegység (HoxE) a fotoszintézishez kapcsolt *in vivo* elektrontranszportban játszik szerepet. Ezek az enzimek cianobaktériumokban és fotoszintetizáló bíbor baktériumokban fordulnak elő, például *Anabaena variabilis*-ben (Serebryakova és mtsai., 1996), *Anacystis nidulans*-ban (Boison és mtsai., 1998) és *T. roseopersicina*-ban is (Hox1, lásd alább) (Rákhely és mtsai., 2004). Hat alegységes szolubilis Hox-típusú hidrogenázt azonosítottak *Ralstonia eutropha*-ban, amelyben a HoxFUYH alegységek mellett az elektrontranszportban szerepet játszó, a NADH mellett NADPH megkötésére is alkalmas HoxI dimer formában (HoxI<sub>2</sub>) van jelen (Burgdorf és mtsai., 2005).

A  $H_2$  érzékelő hidrogenázok képesek a  $H_2$ -t alternatív energiaforrásként hasznosítani litotróf körülmények között. Ezek általában a citoplazmában elhelyezkedő, heterodimer felépítésű, nem oxigén érzékeny enzimek, amelyek nem rendelkeznek szignál szekvenciával a kis alegységükön. A sejt környezetében lévő hidrogén mennyiségétől függően szignál transzdukciós útvonalon keresztül szabályozzák a Hup-típusú hidrogenázok expresszióját (Dischert és mtsai., 1999).  $H_2$  érzékelő funkcióval rendelkezik a *Ralstonia eutropha* HoxBC (Lenz és mtsai., 1997), a *R. capsulatus* és a *B. japonicum* HupUV hidrogenáz enzime (Black és mtsai., 1994; Elsen és mtsai., 1996).

### 1.3. Hidrogenázok expressziójának szabályozása

A prokarióták könnyen és gyorsan képesek adaptálódni környezetük megváltozott kémiai összetételéhez. Természetes környezetükben a sejtek számára rendelkezésre álló tápanyagok és egy komplex szabályozó rendszer határozza meg a szubsztrátok hierarchikus felhasználását, valamint garantálja a hatékony metabolizmust (Cammack 2001). A *Methanococcus voltae*-ban található NiFeSe hidrogenázok konstitutívan termelődnek, ezzel szemben a NiFe hidrogenázok csak Se-mentes környezetben (Sorgenfrei és mtsai., 1997). Hasonlóan a *Methanosarcina mazei* két membránkapcsolt hidrogenáza közül az egyik szintézise folyamatos, míg a másik enzim termelődését gátolja az acetát jelenléte (Deppenmeier 1995).

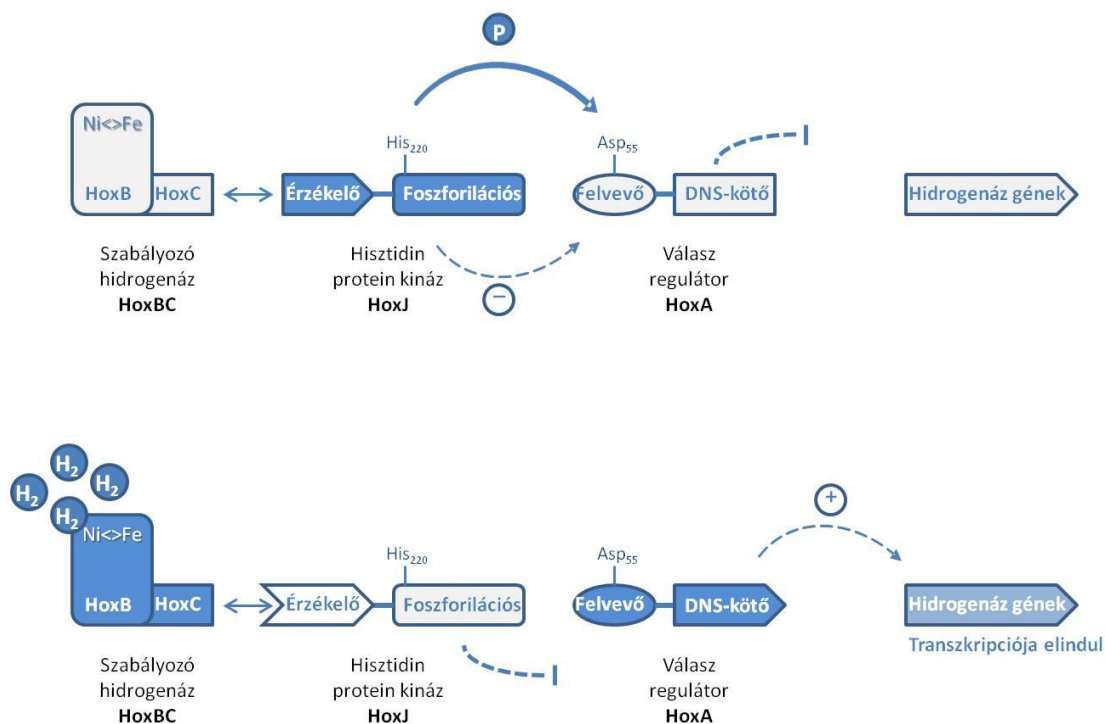
Genomikai vizsgálatok alapján elmondható, hogy sok esetben a hidrogenáz gének szorosan egymás mellett, egy operonban helyezkednek el a genomban. Operonokba rendeződött hidrogenáz struktúr és kisegítő géneket figyelhetünk meg számos Baktériumban és Archaeában, például a *R. capsulatus*-ban, az *E. coli*-ban és a *Methanococcus voltae*-ben. A gének operonba rendeződése lehetővé teszi, hogy az expressziójukat egy elsődleges regulátor szabályozza. A regulátor a transzkripció kezdőpontjához közel lévő promóterhez kötődik. A szabályozó fehérje pozitív illetve negatív hatásával serkenti vagy gátolja a transzkripciót. A regulátor aktivitását általában egy kis molekulásúlyú vegyület képes megváltoztatni (szubsztrátok, metabolitok). A hidrogenáz operonok másik csoportját egy komplex szignáltranszdukciós kaszkád szabályozza. A kaszkádban lévő szenzor fehérje a regulátor protein kémiai módosításán keresztül erősíti vagy csökkenti a transzkripció intenzitását (Cammack 2001).

A baktériumok által leggyakrabban használt mechanizmus a környezeti változásokra az úgynevezett kétkomponensű szabályozó rendszer, amely foszforiláció – defoszforiláció révén továbbítja az információt. Az általános kétkomponensű rendszer egy szenzor és egy válasz regulátor fehérjéből áll. A szenzor hisztidin protein kinázok ATP felhasználásával képesek foszforilálni a válasz regulátor fehérjét (Hoch és mtsai., 1995). Ilyen kétkomponensű regulátor rendszert azonosítottak a *B. japonicum* (Van Soom és mtsai., 1999), a *R. capsulatus* (Dischert és mtsai., 1999) és a *R. eutropha* (Lenz és mtsai., 1998) hidrogenáz géncsoportjában. *R. leguminosarum* hidrogenáz génjeinek expressziója kapcsolódik a szimbiotikus nitrogénfixáláshoz és két regulátor, az FnrN és a NifA fehérjék szabályozzák a körforgást (Brito és mtsai., 1997).

#### *Ralstonia eutropha* hidrogén érzékelése és szabályozása

A *R. eutropha* fakultatív kemolitoautotróf  $\beta$ -proteobaktérium három NiFe hidrogenáz enzimmel rendelkezik (a HoxKG membrán-asszociált, a HoxYH citoplazmatikus és a HoxBC szabályozó hidrogenáz). Habár a baktérium természetes aerob közegében kevés hidrogén található, a hidrogenázok szintézise  $H_2$  általi szabályozás alatt áll. A szignáltranszdukciós útvonalat a HoxBC hidrogenáz, a HoxJ hisztidin szenzor protein kináz, a HoxA válasz regulátor és a RpoN  $\sigma^{54}$  faktor alkotja. A HoxA nem foszforilált formában (hidrogén jelenlétében) aktiválja a *R. eutropha* membránkapcsolt és citoplazmatikus hidrogenáz gének transzkripcióját. Hidrogénmentes környezetben a HoxJ foszforilálja a HoxA-t (a foszfát csoport a HoxJ His220-ról átkerül a HoxA Asp55 aminosavra), ezáltal gátolja a hidrogenáz gének transzkripcióját. A HoxBC és a HoxJ közötti szabályozó interakció a HoxBC-ben történő  $H_2$  mediált konformációváltozással megy végbe. Hidrogén jelenlétében a HoxBC konformációja úgy változik meg, hogy ezáltal megakadályozza a HoxJ kináz aktivitását bármilyen fehérje-fehérje kölcsönhatás révén (2. ábra) (Lenz és mtsai., 1998).

Az érzékelő hidrogenáz *R. eutropha*-ban dimer felépítésű, a HoxC nagy alegység és a HoxB kis alegység alkotja. A hidrogenáz aktivitása és funkciója is Ni-függő, azonban  $O_2$  toleráns a működése (Pierik és mtsai., 1998).



2. ábra: Hidrogénfüggő szignáltranszdukció *R. eutropha*-ban

### *Rhodobacter capsulatus* hidrogén érzékelése és szabályozása

A molekuláris H<sub>2</sub> az elsődleges környezeti faktor, amely serkenti a *R. capsulatus*-ban található membránkapcsolt hidrogenázok szintézisét. A legmagasabb expressziós szint sötétben, H<sub>2</sub> és O<sub>2</sub> jelenlétében növesztett sejteken volt megfigyelhető, valamint autotróf körülmények között, amikor CO<sub>2</sub> a szénforrás és H<sub>2</sub> a redukáló erő a sejtek számára (Colbeau és mtsai., 1992).

A *R. eutropha*-nál ismertetett H<sub>2</sub> szignál transzdukciós kaszkád rendszer található *R. capsulatus*-ban is. Egy szabályozó szolubilis NiFe hidrogenázból (HupUV) és egy kétkomponensű szabályozó rendszerből (HupT/HupR, szenzor kináz és aktivátor) épül fel a kaszkád. A HupR aktivátor szükséges a H<sub>2</sub> által indukált *hupSL* génexpresszióhoz (Toussaint és mtsai., 1997). A HupR hidrogén jelenlétében nem-foszforilált állapotban aktív. A HupT szenzor protein kináz negatív szabályozás alatt tartja a hidrogenáz szintézist, amíg nincs hidrogén a környezetben. HupT<sup>-</sup> mutánsban kétszer akkora *in vivo* hidrogenáz aktivitás figyelhető meg, mint a vad típusú B10 törzsben (Elsen és mtsai., 1993). A HupT és a HupR fehérjék transzfoszforilációval kommunikálnak egymással, tehát a HupT a HupR-re helyezett foszfát csoporttal képes gátolni a *hupSL* expresszióját (Dischert és mtsai., 1999). A HupT<sup>-</sup> mutánshoz hasonlóan a HupUV<sup>-</sup> mutáns törzs hidrogenáz szabályozása megszűnik,

H<sub>2</sub> jelenlétében és hiányában egyaránt folyamatos hidrogenáz expresszió figyelhető meg (Elsen és mtsai., 1996).

A fotoszintetikus baktériumokban azonosított RegB/RegA regulátor rendszer a sejt teljes redox állapotát szabályozza. A RegA válasz regulátor fehérje a fotoszintézis anaerob aktivátora, mely a RegB hisztidin kináz által foszforilált állapotba kerül, így gátolja a hidrogenáz gének expresszióját *R. capsulatus*-ban. A RegB/RegA globális redox szabályozó rendszer a HupT/HupR komplexen keresztül szabályozza a hidrogenáz gének expresszióját. A RegB/RegA a NifA transzkripció aktivátor expressziójának növelésével képes serkenteni a nitrogénáz szintézisét. Ezen ismeretek alapján elmondható, hogy genetikai kapcsolat van *R. capsulatus*-ban az hidrogén felvevő hidrogenáz és a nitrogénáz szintézise között (Elsen és mtsai., 2000).

Összefoglalásként elmondható, hogy a hidrogenáz enzimek működését szabályozhatja számos környezeti tényező és a hidrogenáz enzimek fiziológias szerepe.

#### 1.4. A NiFe hidrogenázok bioszintézise

Egy aktív NiFe hidrogenáz kialakulásához többlépcsős poszttranszlációs érési folyamaton megy keresztül az enzim, melyhez számos kisegítő fehérje jelenléte szükséges. Ezen fehérjék egy része hidrogenáz pleiotróp hatású (Hyp fehérjék), másik részük specifikusan egyféle hidrogenáz éréséért felelős. A Hyp fehérjék Baktériumokban és Archeákban találhatók, a mikroorganizmus összes hidrogenázának érésében részt vesznek. Jelenlegi ismereteink alapján 10-15 segédfehérje szükséges egy aktív NiFe hidrogenáz létrejöttéhez (Cammack 2001).

A NiFe hidrogenázok bioszintézisének egyik legtöbbet tanulmányozott modellje az *E. coli* 3-as hidrogenáza. A folyamatban hét Hyp fehérje (HypA, HypB, HypC, HypD, HypE, HypF) és néhány enzimspecifikus endopeptidáz vesz részt. A chaperon-szerű HypC és a HypD fehérjék komplexet alkotva megkötik a Fe iont és az éretlen nagy alegységhez szállítják (Blokesch és mtsai., 2004). A HypC nyitott konformációban tartja a nagy alegységet a fémionok beépüléséig (Blokesch és mtsai., 2002; Magalon és mtsai., 2000). A CN és a CO ligandok szintézise a HypF-HypE komplex révén valósul meg (Reissmann és mtsai., 2003). A CN ligandok megfelelő formáját a HypF-HypE komplex a HypC-HypD által kötött Fe ionhoz kapcsolja. Miután a Fe a helyére került következik a Ni beépítése a



[illegible]

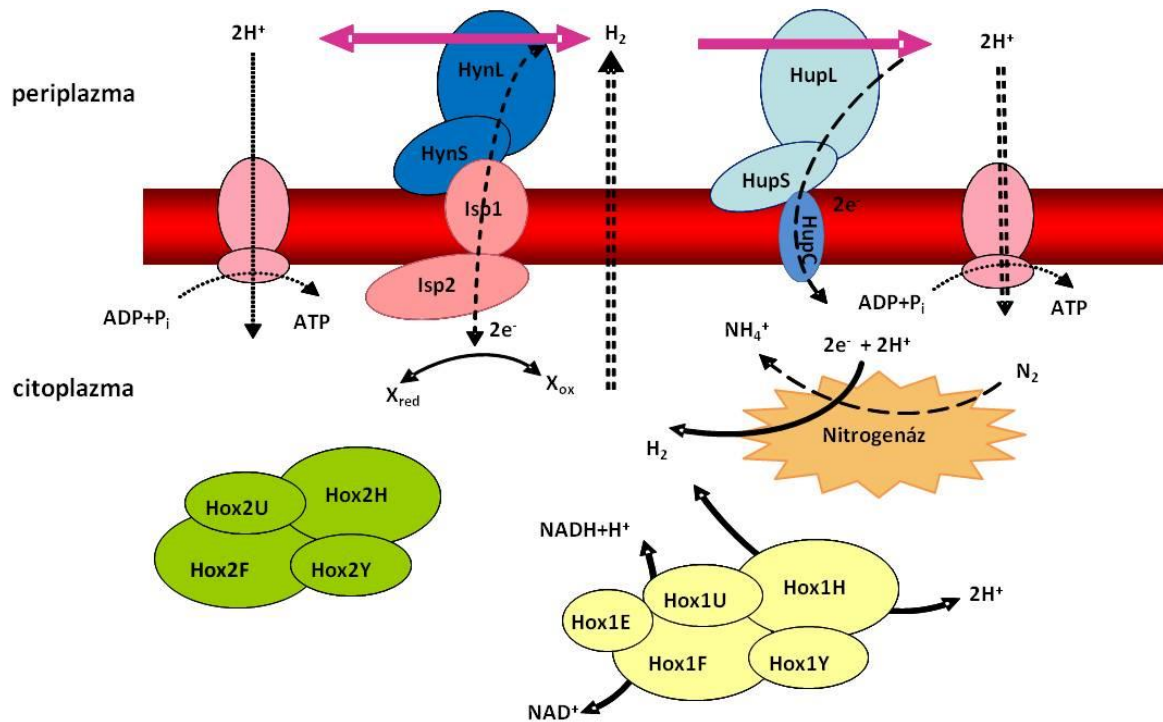
16

## 2. *Thiocapsa roseopersicina* BBS

Modellorganizmusunk, a *Thiocapsa roseopersicina* BBS, a *Chromatiaceae* családba tartozó Gram-negatív, fotoszintetizáló, bíbor kénbaktérium. Az első izolátumok a Jeges-tengerből származtak (Bogorov 1974). A baktérium sejtek 1-3  $\mu\text{m}$  átmérőjű nem mozgékony coccusok. A *T. roseopersicina* természetes élőhelyén a hőmérséklet, az oxigén- és a kénkoncentráció állandó változásának köszönhetően nagy tűrőképességgel rendelkező baktérium (Visscher és mtsai., 1990). Laboratóriumi körülmények között optimális növekedési hőmérséklete 25-28°C között van, szaporodása 30°C felett gátolt (Bogorov 1974). A vad típusú BBS törzs folyékony tápoldatban 5-6 nap alatt nő fel, lemezen 12-14 nap alatt képez telepeket. Az anaerob fototróf baktériumok, mint a *T. roseopersicina* nem képesek vízbontásra, így nem termelnek oxigént, amely gátolná hidrogenáz enzimeik működését. Fototróf körülmények között elektrondonorként redukált kénvegyületeket (elsősorban tioszulfátot, elemi ként és szulfidot) valamint szerves szubsztrátokat (ecetsavat) hasznosít. Aerob és mikroaerofil körülmények között kemolitoautotróf életmódot folytat (Kondratieva és mtsai., 1976). Alternatív nitrogénforrást nem tartalmazó tápoldatban történő növesztéskor nitrogénáz enzime a légköri nitrogén megkötésére képes (Bogorov 1974), amely reakció során melléktermékként jelentős mennyiségű hidrogén képződik. A *T. roseopersicina* hidrogén metabolizmusának kulcsszereplői a négy aktív NiFe hidrogenáz és a nitrogénáz enzimek.

### 2.1. *Thiocapsa roseopersicina* hidrogenázai és szabályozásuk

A *T. roseopersicina* négy aktív hidrogenázzal rendelkezik, melyek sejten belüli elhelyezkedésük, felépítésük és *in vivo* szerepük alapján egymástól jól elkülöníthetők (Kovács és mtsai., 2005; Maróti és mtsai., 2010). Két hidrogenáz (a kétirányú HynSL és  $\text{H}_2$  felvevő HupSL) a periplazmatikus membránhoz kapcsolódik, míg két Hox-típusú szolubilis hidrogenáz (a reverzibilis Hox1 és a  $\text{H}_2$  termelő Hox2) a citoplazmában található (4. ábra). A Hyn és a Hup, valamint a Hox1 és a Hox2 hidrogenázok a sejtben betöltött szerepük mellett felépítésükben is jelentős eltéréseket mutatnak. A négy aktív hidrogenáz mellett található egy további hidrogenáz géneket kódoló régió a *T. roseopersicina* genomjában, ezek a gének (*hupTUV*) azonban nem expresszálódnak. A *hupUV* által kódolt enzim homológjai más mikroorganizmusokban szabályozó funkciót látnak el.



4. ábra: A *T. roseopersicina* funkcionális hidrogenázainak és nitrogénáz enzimének sejten belüli elhelyezkedése

A *T. roseopersicina* hidrogenáz enzimeinek érésére alapvetően érvényes a korábban ismertetett *E. coli* 3-as hidrogenázának érési modellje. A *T. roseopersicina* HypA, HypB, HypD, HypE és HypF mellett két HypC fehérjével rendelkezik, melyek szintén esszenciálisak az aktív HynSL, HupSL, Hox1 és Hox2 hidrogenázok kialakulásához. A pleiotróp fehérjék mellett mind a négy hidrogenáz esetében egy az adott enzimre specifikus endopeptidáz szükséges az adott hidrogenáz bioszintéziséhez: Hyn-specifikus HynD, Hup-specifikus HupD, Hox1-specifikus HoxW és a Hox2-specifikus Hox2W fehérjék. A *hupD* a *hoxW* és a *hox2w* gének a *hup* illetve a *hox1* és *hox2* operonokban helyezkednek el, ezzel szemben a *hynD* gén a szubsztrátját kódoló gén-t (*hynL*) is tartalmazó operontól távol található a genomban (Maróti és mtsai., 2003; Maróti és mtsai., 2010).

### 2.1.1. HynSL hidrogenáz

A HynSL különleges stabilitási sajátságokkal rendelkező kétirányú hidrogenáz (Kovács és mtsai., 1990). Ez az enzim sokkal aktívabb 85°C-on mint szobahőmérsékleten, annak ellenére, hogy a sejt optimális növekedési hőmérséklete 25°C körül van. Oxigénnek való kitettség hatására sem veszíti el katalitikus aktivitását, sőt a membránról való leválasztás után is hosszú ideig aktív marad. A struktúrgének elrendeződése szokatlan, hiszen a kis (*hynS*) és a nagy (*hynL*) alegységeket kódoló gének között két nyitott leolvasási keret található (*isp1*, *isp2*), melyek valódi fehérjéket kódolnak. Az Isp fehérjék szükségesek a Hyn hidrogenáz *in vivo* aktivitásához, ezzel szemben hiányuk nem befolyásolja sem az *in vitro* aktivitást, sem a *hyn* struktúrgének expresszióját (Rákhely és mtsai., 1998). Fiziológiai funkciója valószínűleg a sejt kén metabolizmusához való kapcsolódása révén a redox egyensúly fenntartásában való részvétel, ennek megfelelően mind hidrogén termelésére, mind felvételére képes az elektronellátottság függvényében. Expressziója oxigénfüggő (anaerob körülmények szükségesek a gének kifejeződéséhez), az FNR (fumarát nitrát reduktáz) regulátoron keresztül szabályozott (Kovács és mtsai., 2005). A HynSL általi hidrogéntermelés fényfüggő folyamat, csak fényen történő növesztéskor képes hidrogén termelésre (Tengölics és mtsai., 2014).

A legtöbb mikroorganizmusban a hidrogenáz gének expressziója kizárólag anaerob körülmények között valósul meg, tehát az oxigén az egyik legfontosabb szabályozó szignál (Sawers 1999). Az *E. coli* *hya* és *hyb* hidrogenáz géneket az FNR és az ArcA regulátorok szabályozzák oxigén jelenlétében (Richard és mtsai., 1999). A *T. roseopersicina* *hyn* szabályozó régiójában, a *hynS* gén előtt két FNR kötőhely található. A *T. roseopersicina* genomban azonosított *fnrT* gén által kódolt fehérje közel 70%-os hasonlóságot mutat az *E. coli* FNR fehérjéjével. A  $\Delta fnrT$  *T. roseopersicina* törzsben hidrogenáz génexpressziós és fenotipikus változások egyaránt megfigyelhetők a vad típusú BBS-hez képest. Ilyen megfigyelés például az, hogy acetáton történő növesztéskor a vad típusú sejtekben nem képződnek kén globulusok, ezzel szemben a  $\Delta fnrT$  törzs sejtjeiben jelentős mennyiségű kénszemcse halmozódik fel, ami arra enged következtetni, hogy az FnrT globális regulátor szerepet tölt be a *T. roseopersicina*-ban. *fnrT* gén hiányában a *hyn* operon expressziója jelentősen lecsökken, a *hyn* operon mRNS szintje mindössze a vad típusban mért mRNS szint 5%-a, a HynSL hidrogenáz aktivitása pedig a vad típusban mért HynSL aktivitás 25 %-át éri el az *fnrT* mutánsban. A HupSL és a Hox1 hidrogenázok aktivitását nem befolyásolja az FnrT hiánya. Az FnrT fehérje anaerob körülmények között aktiválja a *T.*

*roseopersicina hynSL* gének kifejeződését. A *hynS* szabályozó régiójában található egy FnrT-függő, valamint legalább egy FnrT-független promóter. Az FnrT-függő promóter működéséhez FNR kötődése szükséges a *hynS* szabályozó régió két meghatározott pontjához (-41 és -80 pozíció) (Kovács és mtsai., 2005).

### 2.1.2. HupSL hidrogenáz

A másik membránkötött NiFe hidrogenáz enzim, a HupSL sokkal érzékenyebb; hő, oxigén, és a membránról való leválasztás azonnal inaktíválja (Colbeau és mtsai., 1994). Feltételezett szerepe a nitrogénáz által termelt hidrogén visszaforgatása, ezáltal energianyerés a sejt számára. A genomban a kis és a nagy alegységet kódoló gének mögött található a *hupC* citokróm b-típusú fehérjét kódoló gén, amely szükséges az *in vivo* Hup aktivitáshoz, de hiánya nem befolyásolja az *in vitro* aktivitást. A HupC feltételezhető feladata az elektronok továbbítása a HupSL fehérjéről a kinon raktár irányába (Palágyi-Mészáros és mtsai., 2009). A HupD proteáz a HupL fehérje C-terminális végét hasítja le a nagy alegység bioszintézisének utolsó lépéseként. A HupH fehérje komplexet képez a HupS-sel, szükséges a kis alegység éréséhez, valamint a HupSL komplex membránhoz való transzlokációjához. A HupI egy rubredoxin típusú fehérje, amely feltételezhetően a HupS érésében játszik szerepet. A HupR válasz regulátor fehérje esszenciális a *hupSL* transzkripciójához (Colbeau és mtsai., 1994). A HupI és a HupR fehérjét kódoló gének között található *orf1* szekvenciájáról korábban azt feltételezték, hogy fehérjét nem kódoló szakasz az operonban (5. ábra). A *hup* gének expressziója kapcsolatban áll a sejt redox állapotával, valamint a *hox1* hidrogenáz gének expressziójával, Hox1 enzim hiányában ( $\Delta hox1H$ ) a *hupSL* gének expressziós szintje nagy mértékben lecsökken (Palágyi-Mészáros és mtsai., 2009). A Hyn és a Hup hidrogenázok struktúrfehérjei 50%-os ( $\pm 5\%$ ) homológiát mutatnak egymással (HynS–HupS és HynL–HupL) (Rákhely és mtsai., 1998), mindkét enzim kis alegységének N-terminálisán megtalálható a Tat (twin-arginin transzport) útvonalra jellemző szignál szekvencia, így valószínűsíthető, hogy a Tat-rendszeren jutnak el a sejtmembrán periplazmatikus oldalára (Sargent és mtsai., 1999).



5. ábra: *hupSL* operon *T. roseopersicina*-ban

Számos baktériumban megfigyelhető, hogy a hidrogenázt kódoló gének expresszióját egy hidrogénérzékelő hidrogenáz és egy kétkomponensű rendszer szabályozza, mint például *R. capsulatus*-ban a HupUV érzékelő és HupT/HupR szabályzó rendszer (Dischert és mtsai., 1999). *T. roseopersicina*-ban szintén megtalálhatóak a tipikus szignáltranszdukciós rendszert alkotó fehérjéket kódoló gének, azonban csak a HupR tölti be funkcióját a sejtben, a *hupT* és a *hupUV* génekről nem képződik fehérje, így a hidrogénérzékelő rendszer *T. roseopersicina*-ban nem működik. A HupSL hidrogenázt kódoló gének expressziója folyamatos, a hidrogén jelenlététől függetlenül. A *hupSL* struktúrgének transzkripciója egy RpoN-függő promóteren keresztül szabályozott (Kovács és mtsai., 2005).

A *hupS* gén előtt található promóter működéséhez RpoN ( $\sigma^{54}$  faktor) kapcsolódása szükséges. A  $\Delta rpoN$  törzs ammóniummentes közegben nem képes felnőni, ami az jelenti, hogy inaktív a  $N_2$ -fixáló rendszere, valamint a HupSL hidrogenáz aktivitását is elveszti a törzs. A funkcionálisan aktív RpoN szükséges a *hupSL* gének kifejeződéséhez (Kovács és mtsai., 2005).

A *T. roseopersicina* HupR fehérjéje magas hasonlóságot mutat a *R. eutropha* HoxA, valamint a *R. capsulatus* HupR fehérjével. A  $\Delta hupR$  törzsben teljesen megszűnik a HupSL aktivitás, míg a Hox1 hidrogenáz működését nem befolyásolja ez a mutáció, így elmondható, hogy a HupR szükséges a *hupSL* expresszióhoz, de nem szükséges a sejtben zajló teljes  $H_2$ -függő szabályozáshoz (Kovács és mtsai., 2005).

A *T. roseopersicina* genomban található *hupT* és *hupUV* gének által kódolt aminosavsorrend az *Azorhizobium caulinodans* HupT és HupUV fehérjék aminosavsorrendjével mutatja a legmagasabb fokú homológiát (Baginsky és mtsai., 2004). A *hupT* és a *hupUV* gének *T. roseopersicina* genomból történő eltávolítása nincs hatással a *hupSL* gének expressziójára. Abban az esetben, ha plazmidról íródik át a HupT a törzs teljesen elveszti HupSL aktivitását hidrogén jelenlétében és hiányában egyaránt, azaz a HupT fehérje képes kifejteni represszor hatását. Ezzel szemben a *hupUV* plazmidon történő sejtbe juttatása nincs hatással a *hupSL* gének expressziójára. A *hupTUV* gének plazmidról történő kifejeztetése esetében sem válik hidrogénfüggővé a *hupSL* gének expressziója. A *hupTUV* gének csendességének lehetséges magyarázata, hogy a *hupT* gén előtt található csonka *nifS* gén poláris hatása akadályozza meg a *hupTUV* génekről történő mRNS átíródást. A funkcionálisan inaktív *hupTUV* tehát konstitutív *hupSL* génexpressziót eredményez a vad típusú *T. roseopersicina* törzsben (Kovács és mtsai., 2005).

A *hupSL* struktúrgének után a genomban található *hupC* egy b-típusú citokróom fehérjét kódol. A HupC nem játszik szerepet a HupSL hidrogenáz érésében, azonban hatással van az *in vivo* aktivására, valamint *hupSL* kifejeződésére (Palágyi-Mészáros és mtsai., 2009). Hiányában feltételezhetően elzáródik az elektronok útja a HupSL hidrogenáztól a kinonraktár irányába, az oxidáltabb állapotú kinonraktár pedig pozitívan befolyásolhatja a *hupSL* hidrogenáz gének expresszióját (Maróti és mtsai., 2010). A *hupH* és a *hupI* gének hiánya nem befolyásolja a HupSL működését, míg a *hupR* gén hiányában csökken az enzim aktivitása.

A *T. roseopersicina* sejtek számára rendelkezésre álló fotoszintetikus elektrondonor (tioszulfát) mennyisége a tápoldatban befolyásolja a *hupSL* gének expresszióját. Az alacsonyabb tioszulfát koncentráció magasabb szintű *hupSL* génkifejeződést eredményez. Ez a regulátor hatás valószínűleg a kinonraktáron keresztül realizálódik (Palágyi-Mészáros és mtsai., 2009).

### 2.1.3. Hox1 hidrogenáz

A Hox1 heteropentamer hidrogenáz a citoplazmában helyezkedik el. A Hox1YH a hidrogenáz aktivitásért felelős alegységek, a Hox1FU diaforáz alegységek pedig a  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  redox reakciót katalizálják (Friedrich és mtsai., 1993; Rákhely és mtsai., 2004). A cianobakteriális Hox-típusú hidrogenázokra jellemző Hox1E ötödik alegység nélkülözhetetlen az enzim *in vivo* aktivitásához (Tamagnini és mtsai., 2002). A Hox1 *in vitro* aktivitását nem befolyásolja a *hox1E* delécioja. Mivel a Hox1E alegység hiányában csak a mesterséges elektron akzeptort vagy donort tudja hasznosítani az enzim, feltételezhető, hogy a Hox1E az elektrontranszportban közreműködő fehérje (Palágyi-Mészáros és mtsai., 2009). A Hox1 hidrogenáz valódi kétirányú enzimként működik, nitrogénáz-gátolt körülmények között hidrogént termel, valamint a nitrogénáz enzim által végzett nitrogénfixálás során képződő hidrogén visszavételre is képes, működése erősen kapcsolódik a sejt kénmetabolizmusához (Rákhely és mtsai., 2004). A Hox1 hidrogenáz hidrogéntermeléshez használt elsődleges elektrondonorja az elemi kén, emellett a szulfít szulfáttá történő oxidációja is serkenti a folyamatot. Ezen redox reakciók a kinon raktárral állnak kapcsolatban, amelyből arra következtethetünk, hogy a Hox1 hidrogenáz a működéséhez szükséges elektronokat a kinon raktárból nyeri. Ezáltal védi a sejteket a membrán redox rendszerének túlredukciójától (Tengölics 2014).



A Hox-típusú NiFe hidrogenázok a fotoszintetikus mikroorganizmusokra jellemző enzimek (de például *R. eutropha*-ban is megtalálható). A *T. roseopersicina* sötétben és fényen történő növesztéskor egyaránt képes hidrogéntermelésre Hox1 hidrogenáza révén. Sötétben fermentáció során termel H<sub>2</sub>-t a baktérium, míg fényen redukált kénvegyületeket hasznosít hidrogéntermelésre. A Hox1 aktivitása fényen, valamint az enzimet kódoló gén expressziója egyaránt függ a sejtek számára rendelkezésre álló redukált kénvegyületek (tioszulfát, elemi kén) mennyiségétől. A Hox1 hidrogenázt a *hox1EFUYH* gén egy operonba rendeződve kódolják a genomban. További *orf*-ek találhatók a *hox1* operonban, melyek közül a *hox1H* után található *orf3* egy olyan hidrogenáz-érési proteáz kódol (*hoxW*), melynek a hidrogenáz bioszintézisében van szerepe. A *hox1E* gén előtt található a genomban egy  $\sigma^{54}$ - típusú promóter, feltételezhetően ez szabályozza a *hox1* gén expresszióját (Rákhely és mtsai., 2004). A Hox1 hidrogenáz fényen történő hidrogéntermelése tioszulfát-függő, a tápoldat tioszulfát koncentrációjának növelésével a Hox1 általi hidrogéntermelés jelentősen növelhető (Rákhely és mtsai., 2007).

#### 3.1.4. Hox2 hidrogenáz

A Hox2 szolubilis hidrogenáz heterotetramer felépítésű enzim. A Hox1-hez hasonlóan Hox2YH hidrogenáz és Hox2FU diaforáz alegységekkel rendelkezik. A Hox2 enzim a *Methylococcus capsulatus* hidrogenázához mutatja a legmagasabb fokú hasonlóságot. A Hox2 nem képes a tioszulfátot közvetlen elektronforrásként hasznosítani, ezért kizárólag glükózzal kiegészített, alacsony tioszulfát koncentrációjú tápoldatban történő növesztéskor mutatható ki alacsony szintű *in vivo* hidrogéntermelő aktivitása (Maróti és mtsai., 2010).

A Hox2 hidrogenáz aktivitása fényfüggő és glükózt igényel. Ezzel szemben a *hox2* gén expresszióját nem befolyásolja, hogy fényen vagy sötétben nőnek a sejtek. A Hox2 *in vivo* hidrogéntermelő aktivitása kizárólag alacsony tioszulfát koncentrációjú glükózzal kiegészített tápoldat alkalmazásakor mérhető, a génexpresszió szempontjából is ez az ideális közeg. Azonban magas tioszulfát koncentráció mellett, illetve glükóz hiányában is több mint 40%-os *hox2H* génkifejeződés figyelhető meg. A *hox2* hidrogenáz gén egy operonban találhatóak, azonban a *hox2FU* génekről egy rövidebb alternatív transzkript is képződik, ennek köszönhető, hogy a *hox2FU* géneknek jóval magasabb az mRNS szintje, mint a *hox2YH* géneké azonos körülmények között. (Maróti és mtsai., 2010).



### 3. *Ralstonia eutropha* és hidrogenáz enzime

A *R. eutropha* fakultatív kemolitoautotróf Gram-negatív proteobaktériumot az 1960-as évek elején *Alcaligenes eutrophus*-ként azonosították (Bartha 1962). A jelenlegi nevezéktan szerint a *Cupriavidus necator* nevet is használják erre a baktériumra. A *R. eutropha* optimális növekedési hőmérséklete 30°C, tápoldatban egy nap alatt felnő, lemezen két nap alatt képez telepet. A baktérium heterotróf módon fruktóz és glicerin jelenlétében nagyságrendekkel nagyobb hidrogenáz aktivitással rendelkezik, mint autotróf körülmények között. Autotróf növesztéshez nikkelt tartalmazó nyomelem komplexre van szüksége a mikrobának (Bartha és mtsai., 1965; Friedrich és mtsai., 1981). A *R. eutropha* egy membránkapcsolt, egy citoplazmatikus és egy érzékelő hidrogenáz enzimmel rendelkezik, melyek expressziója erősen hidrogénfüggő (Pierik és mtsai., 1998).

A membrán kapcsolt hidrogén visszavevő hidrogenáz (MBH) nagy alegységét a *hoxG*, kis alegységét a *hoxK* gén kódolja. A struktúrgének mellett számos kisegítő gén (*hoxZ*, *hoxM*, *hoxL*, *hoxO*, *hoxQ*, *hoxR*, *hoxT*, *hoxV*) által kódolt fehérje szükséges az aktív enzim kialakulásához (Kortluke és mtsai., 1992). Egyes kisegítő gének hiánya részben, mások delécioja teljesen megszünteti a HoxGK hidrogenáz aktivitását. Kulcsfontosságú a HoxZ b-típusú citokróm fehérje a membránkapcsolt hidrogenáz működése szempontjából. A HoxZ behorgonyozza a hidrogenázt a periplazmatikus membránba, összeköti a HoxK-t az elektrontranszport láncsal, aktiválja az enzimet és stabilizálja a hidrogenáz aktivitását (Bernhard és mtsai., 1996). A *R. eutropha* HoxZ fehérjéje a *T. roseopersicina*-ban található HupC citokróm fehérjével homológ.

A citoplazmatikus (SH) kétirányú hidrogenáz elsődleges funkciója a NAD<sup>+</sup>-redukciója, emellett NADH-ból történő H<sub>2</sub> termelésre is képes, igaz jóval kisebb arányban (Schneider és mtsai., 1976). A heterohexamer felépítésű Hox-típusú enzim nem érzékeny az oxigénre és a szén-dioxidra sem (Karstens és mtsai., 2015). A HoxYH hidrogenáz valamint a HoxFU NADH-dehidrogenáz dimer mellett két HoxI alegységgel rendelkezik. A HoxI alegységek könnyen disszociálódnak a HoxF alegységről (akár kismértékű pH változás hatására), az így kialakuló tetramer forma csak a NADH-t tudja hasznosítani, míg a HoxI<sub>2</sub>-t tartalmazó komplett enzim a NADPH-t is fel tudja használni hidrogéntermelésre. Ebből arra következtethetünk, hogy a HoxI NADPH-kötő domént tartalmaz. (Burgdorf és mtsai., 2005).

*R. eutropha*-ban multikomponens szignál transzdukciós rendszer szabályozza a H<sub>2</sub>-függő hidrogenáz gének expresszióját. A hidrogenáz specifikus szabályozó gének a *hoxA*, *hoxB*,

*hoxC* és a *hoxJ*. A két HoxB hidrogenáz kis alegység és a két HoxC hidrogenáz nagy alegység alkotják a regulátor hidrogenázt. A *hoxJ* által kódolt hisztidin protein szenzor kináz hidrogén jelenlétében nem foszforilálja a HoxA válasz regulátor fehérjét. A HoxA nem foszforilált állapotban aktív, transzkripció aktivátorként a membránkapcsolt és a szolubilis hidrogenáz promóteréhez kapcsolódva indítja el a hidrogenáz gének szintézisét (Lenz és mtsai., 1998; Lenz és mtsai., 2002).

## IV. CÉLKITŰZÉSEK

Ahhoz, hogy a jövőben a hidrogenázokat, mint biokatalizátorokat alkalmazni tudjuk a lehető legpontosabban meg kell ismernünk a hidrogéntermelő és hidrogénbontó mikroorganizmusok számára optimális körülményeket, valamint a hidrogenáz enzimeket alkotó strukturális és szabályozó fehérjék felépítését, funkcióját és működését.

1. A *T. roseopersicina* HupSL hidrogenáza felelős a nitrogénáz enzim által termelt hidrogén energetikai hasznosításáért, azaz a hidrogén bontásáért. A hidrogenáz struktúrgének (*hupSL*) által kódolt fehérjék működését jól ismerjük, valamint az operont alkotó csaknem összes gén funkcióját korábban meghatározták. A *hupI* és *hupR* között elhelyezkedő, ez idáig feltételezett *orf*-ként nyilvántartott potenciális gén által kódolt fehérje funkciója azonban tisztázatlan volt.

Ezen gén által kódolt fehérje funkciójának megismeréséhez célul tűztem ki:

- A feltételezett *orf* transzkripciójának vizsgálatát, a gén annotációját.
- A *hupI* és *hupR* között elhelyezkedő *hupO*-ként annotált gén deléciós analízisét annak érdekében, hogy megvizsgáljam a *hupO* génnek és termékének a sejtben betöltött szerepét.
- A HupSL hidrogenáz *in vivo* és *in vitro* aktivitásában bekövetkező változások vizsgálatát a HupO fehérje jelenlétében és hiányában.
- A *hupSL* struktúrgének expresszió mintázatának meghatározását különböző *T. roseopersicina* törzsekben.
- A  $\Delta hupO$  törzsek hidrogénfüggő HupSL hidrogenáz génexpressziójának és fehérjeszintézisének tanulmányozását.
- A HupSL és a további NiFe hidrogenázok közötti kapcsolatok vizsgálatát, elsősorban a HupSL és Hox1 enzimek együttes működését.

2. A *T. roseopersicina* öt alegységből felépülő Hox1 hidrogenáz *hox1E* génje által kódolt fehérje pontos szerepe nem ismert. A *T. roseopersicina* Hox1 enzime és a *R. eutropha* szolubilis hidrogenáza számos hasonlóságot mutatnak, azonban *R. eutropha* esetében az ötödik (és hatodik) alegység a HoxI (dimerként kapcsolódik az enzimkomplexhez), melynek pontos funkciója szintén nem tisztázott. Felmerült a kérdés, hogy a HoxI és Hox1E fehérjék képesek lehetnek-e legalább részben helyettesíteni egymást?

A felmerült kérdések megválaszolásához az alábbi specifikus célokat tűztem ki:

- A HoxI heterológ fehérje bejuttatása különböző hidrogenáz készlettel rendelkező *T. roseopersicina* törzsekbe.
- Annak megvizsgálása, hogy a HoxI jelenléte hogyan befolyásolja a *T. roseopersicina* Hox1 hidrogenázának működését, képes-e helyettesíteni a Hox1E funkcióját.
- Azon gének azonosítása, amelyek expressziójára hatással van a *hox1E* hiánya, valamint a heterológ *hoxI* bevitele *T. roseopersicina*-ba.

## V. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### 1. Baktériumtörzsek és plazmidok

#### 1. Táblázat: Baktérium törzsek megnevezése és leírása

Törzs neve	Genotípus	Referencia
<i>Thiobacillus</i> <i>thiooxidans</i>		
BBS	Vad típus	(Bogorov 1974)
GB 11	BBS $\Delta hynSL$ ; Sm <sup>R</sup>	(Rákhely és mtsai., 2004)
HOD1	GB11 $\Delta hupO$ ; Sm <sup>R</sup>	Ez a munka
HOD1comp	HOD1 pDSKhupOcomp; Sm <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	Ez a munka
GB1131	$\Delta hynSL$ , $\Delta hox1H$ ; Sm <sup>R</sup> , Er <sup>R</sup>	(Palágyi-Mészáros és mtsai., 2009)
HOD13	GB1131 $\Delta hupO$ ; Sm <sup>R</sup> , Er <sup>R</sup>	Ez a munka
HOD13comp	HOD13 pDSKhupOcomp, Sm <sup>R</sup> , Er <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	Ez a munka
GB1121	GB11 $\Delta hupSL$ ; Sm <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup>	(Rákhely és mtsai., 2004)
HoxEDM	GB1121 $\Delta hox1E$ ; Sm <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup>	(Rákhely és mtsai., 2004)
HoxEDMDSK	HoxEDM pDSK6CrtKm; Sm <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	Ez a munka
HoxEDMhoxI	HoxEDM pDSKhoxI; Sm <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	Ez a munka
GB112141	GB1121 $\Delta hox2H$ ; Sm <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup>	(Maróti és mtsai., 2010)
112141DSK	GB112141 pDSK6CrtKm; Sm <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	Ez a munka

112141 <i>hoxI</i>	GB112141 pDSKhoxI; Sm <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	Ez a munka
<i>Escherichia coli</i>		
S17/1 (λpir)	294 ( <i>recA pro res mod</i> ) Tp <sup>R</sup> , Sm <sup>R</sup> (pRP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7), λpir	(Herrero és mtsai., 1990)

## 2. Táblázat: Plazmidok megnevezése és leírása

Plazmid neve	Genotípus	Referencia
pK18 <i>mobSacB</i>	<i>sacB</i> , RP4 <i>oriT</i> , ColE1 <i>ori</i> ; Km <sup>R</sup> ,	(Schäfer és mtsai., 1994)
pDSK6CrtKm	pDSK509 replicon <i>T. roseopersicina crtD</i> promóterrel, Km <sup>R</sup>	(Fodor és mtsai., 2004), Balogh Tímea
pKhupOup	<i>hupO</i> upstream régiója pK18 <i>mobSacB</i> plazmidban	Ez a munka
pKhupOD	<i>hupO</i> gén upstream és downstream régiói a pK18 <i>mobSacB</i> plazmidban; <i>hupO</i> gén in frame deléció konstrukciója	Ez a munka
pDSKhupOcomp	<i>hupO</i> gén pDSK6CrtKm plazmidban, komplementáció konstrukció	Ez a munka
pDSKhoxI	<i>hoxI</i> gén pDSK6CrtKm plazmidban	Ez a munka

## 2. Baktériumok tenyésztése

### *T. roseopersicina* növesztése

A *T. roseopersicina* törzseket 25-28°C-on folyamatos megvilágítás mellett, teletöltött csiszolt dugós üvegekben, Pfennig-féle (PC) tápoldatban növesztettem (Pfennig és mtsai., 1983). A hidrogenáz aktivitásmérésekhez 5 µM-os végkoncentrációjú NiCl<sub>2</sub>-dal egészítettem ki a különböző Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-ot tartalmazó PC tápoldatokat. A különböző antibiotikumokat a következő koncentrációkban alkalmaztam: 5 µg/ml sztreptomycin, 5 µg/ml gentamicin 50 µg/ml eritromicin és 25 µg/ml kanamicin.

PC4 (Pfennig-féle tápoldat) összetétele az alábbi volt 1 literre, desztillált vízben oldva: 20 g NaCl, 4 g Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 2 g NaHCO<sub>3</sub>, 1 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g KCl, 1 g MgCl<sub>2</sub>, 1 g NH<sub>4</sub>Cl, 20 µl B12 vitamin (1 mg/ml), 1 ml 20 mM Fe-EDTA és 1 ml mikroelem oldat, pH=7,0.

A PC0,5 tápoldat 0,5 g/l; a PC1 1g/l; a PC2 2g/l és a PC4 4 g/l nátrium-tioszulfátot tartalmaz.

Mikroelem oldat: 1 literre, desztillált vízben oldva: 2975 mg Na<sub>2</sub>-EDTA, 300 mg H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub>, 200 mg CaCl<sub>2</sub>x6 H<sub>2</sub>O, 100 mg ZnSO<sub>4</sub>x7 H<sub>2</sub>O, 30 mg Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>x2 H<sub>2</sub>O, 30 mg MnCl<sub>2</sub>x4 H<sub>2</sub>O, 20 mg NiCl<sub>2</sub>x6 H<sub>2</sub>O és 10 mg CuCl<sub>2</sub>x2 H<sub>2</sub>O.

### *E. coli* növesztése

Az *E. coli* sejteket 37°C-on Luria-Bertani (LB) folyadékban illetve LB lemezen (LB + 1,5 % agar) tartottam fenn (Bertani 1951). Az *E. coli* tenyésztésénél használt kanamicin antibiotikum koncentrációja lemezen és folyadékban egyaránt 25 µg/ml volt.

LB tápoldat: 10 g/l NaCl, 10 g/l tripton és 5 g/l élesztőkivonat, pH=7,5.

### *R. eutropha* növesztése

A *R. eutropha* H16 vad típusú törzset 30°C-on SL-6 mikroelemoldattal (Dernedde és mtsai., 1996) kiegészített FGN tápoldaton tenyésztettem (Schlegel és mtsai., 1961).

FGN tápoldat: 40 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,2 % fruktóz, 0,2 % glicerin, 0,2 % NH<sub>4</sub>Cl, 0,02% MgSO<sub>4</sub>, 0,001% CaCl<sub>2</sub> és 0,0005% FeCl<sub>3</sub>.

SL-6 mikroelem oldat: 1 literre, desztillált vízben oldva: 300 mgxH<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 200 mg CoCl<sub>2</sub>x6H<sub>2</sub>O, 100 mg ZnSO<sub>4</sub>x7H<sub>2</sub>O, 30 mg MnCl<sub>2</sub>x4H<sub>2</sub>O, 30 mg Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>x2H<sub>2</sub>O, 20 mg NiCl<sub>2</sub>x6H<sub>2</sub>O és 10 mg CuCl<sub>2</sub>x2H<sub>2</sub>O.

### *T. roseopersicina* növekedési sebességének vizsgálata

A leoltást követően 12 óránként spektrofotométerrel (JENWAY 6320D Spectrophotometer) műanyag küvettát használva mértem a sejtek optikai denzitását 600 nm-en a növesztés negyedik napjának végéig, amikor a sejtek teljesen stacioner fázisba kerültek.

## **3. Konjugáció**

A *T. roseopersicina* törzseket a konjugációhoz 28°C-on OD<sub>650</sub>= 1,8-ig, az *E. coli*-t 37°C-on a megfelelő antibiotikum jelenlétében OD<sub>600</sub>= 0,6-ig növesztettem, majd centrifugálás után (17000 g 10 perc), *Thiocapsa* sóoldatban felvéve összekevertem. Az így kapott sejteket 2 g/l Nutrient Broth-ot és 2 g/l Na-acetátot tartalmazó, 1,5 % agarral szilárdított Pfennig-féle (Pfennig és mtsai., 1983) táptalajra cseppentettem. Csak a donor, és csak a recipiens törzseket tartalmazó kontroll kísérleteket is elvégeztem. Egy éjszakán át fényen, levegőn, 28°C-on inkubáltam a lemezeket. Másnap, a keresztezésből hígítási sort készítve szelektív (PCA) lemezre szélesztettem a mindkét baktériumot tartalmazó, valamint a két kontroll lemezről is. A lemezeket anaerob körülmények között (Oxoid AnareoGen rendszerrel anaerobizált dobozokban), fényen 14 napig 28°C-on növesztettem.

*Thiocapsa* sóoldat: 20 g/l NaCl, 1 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g/l KCl és 1 g/l MgCl<sub>2</sub>.

Konjugációs táptalaj: 1 literre desztillált vízben oldva 18 g NaCl, 2 g NaHCO<sub>3</sub>, 2 g Na-acetát, 2 g Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 1 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g MgCl<sub>2</sub>, 1 g KCl, 1 g NH<sub>4</sub>Cl, 2 g Nutrient Broth, 1,5 % Agar, 20 µl B12 (1000 µg/ml), 1 ml mikroelem oldat és 1 ml 20 mM Fe-EDTA.



PCA lemez: 1 literre, desztillált vízben oldva: 18 g NaCl, 2 g NaHCO<sub>3</sub>, 2 g Na-acetát, 2 g Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 1 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g MgCl<sub>2</sub>, 1g KCl, 1 g NH<sub>4</sub>Cl, 0,5 g Na<sub>2</sub>S, 7 g Phyta gél, 20 µl B12 (1000 µg/ml), 1 ml mikroelem oldat és 1 ml 20 mM Fe-EDTA.

#### 4. Tioszulfát koncentrációjának meghatározása

A növesztés minden napján 1 ml *T. roseopersicina* kultúrának a sejtsűrűségét spektrofotometriásan mértük 600 nm-en, majd a mintákat 11.000 g-en centrifugáltam öt percig. A felülúszó frakciót használtam a tioszulfát koncentrációjának méréséhez. A tioszulfát UV abszorpcióval mérhető 230 nm-en. Kalibrációs görbét készítettem különböző hígítású PC4 (4 g/l tioszulfát) tápoldattal. Az abszorbancia értékeket a sejtek optikai denzitás adatait figyelembe véve hasonlítottam össze.

#### 5. DNS manipulációs munkák

##### Plazmid tisztítás *E. coli*-ból

A plazmid izoláláshoz 5 ml antibiotikum tartalmú LB tápoldatba oltottam le egy telepet az adott baktérium törzsből. A sejteket egy éjszakán át 37°C-on rázatva növesztettem. Másnap 2 ml felnőtt kultúrából plazmid DNS-t tisztítottam (Viogene Mini Plus Plazmid DNA Extraction System). A centrifugált sejteket 200 µl MX1 pufferben szuszpendáltam fel, 250 µl MX2 puffer hozzáadását követően 5 percig inkubáltam szobahőmérsékleten, majd 350 µl MX3 pufferrel együtt óvatosan homogenizáltam az elegyet. Centrifugálást követően (10 perc 17.000 g) a sejtlyázatot tartalmazó felülúszó frakciót DNS-kötő oszlopra mértem rá. Centrifugálás után a nem specifikusan kötődő anyagokat először 500 µl WN pufferrel, majd 700 µl WS pufferrel mostam le az oszlopról. A beszárított membránról 50 µl E pufferrel mostam le a tisztított plazmid DNS-t.

### Agaróz gélelektroforézis

Az analitikai és preparatív célokból végzett gélelektroforézisekhez 1%-os, 0,1 µg/ml etídium-bromidot tartalmazó agaróz gélét használtam. A futtatást 10 mM Na-Borát pufferben (pH=8,0), 100 V futtatási feszültséggel végeztem.

### Fragment izolálás

Preparatív agaróz gélelektroforézis után a gélből a megfelelő méretnél található DNS fragmentet steril pengével vágtam ki és egy 1,5ml-es Eppendorf csőbe helyeztem. A DNS izolálását a gélből Macherey-Nagel extrakciós kittel (NucleoSpin Gel and PCR Clean-up) végeztem a protokollban leírt módon. A kivágott ~200 mg géldarabot 400 µl NT pufferben oldottam fel 50°C-on. Az elegyet DNS-kötő oszlopra vittem fel, a szennyeződések 700 µl NT3 pufferrel történő mosással és centrifugálással (1 perc 11.000 g) távolítottam el. A beszárított membránról 50 µl NE pufferrel mostam le a tisztított DNS-t.

### Restrikciós enzimekkel végzett hasítások

A restrikciós emésztéseket Fermentas enzimekkel végeztem. Az enzimeket gyári pufferben használtam 20 µl végtérfogatban a cég instrukciói alapján.

### Ligálás

A ligáláshoz Fermentas T4 DNS ligázt és a gyári pufferét használtam. A beépítendő DNS fragmentumot ötszörös mennyiségben adtam a vektorhoz, az enzim és a puffer mennyiségét az előírásnak megfelelően alkalmaztam. A reakció 16°C-on 12-14 óra alatt ment végbe.

### Polimeráz láncreakció (PCR)

A reakciókat Veriti 96well Thermal Cycler (Applied Biosystems) készülékben végeztem. A Phusion High-Fidelity DNA Polymerase Kit (ThermoFisher Scientific) reagenseit használva mértem össze a reakcióelegyet a protokollban leírtaknak megfelelően 20 µl

végtérfogatban. A denaturációs (95°C), hibridizációs (55-65°C) és extenziós (72°C) lépések paramétereit mindig az adott kísérlet oligonukleotidjainak és templátjainak megfelelően állítottam be. A program 35 ciklusból állt, az első ciklus előtt elő-denaturációs (1 perc 95°C), a 35 ciklus után pedig záró elongációs (5 perc 72°C) lépést alkalmaztam.

## 6. Kémiai kompetens sejt készítés

S17-1 λpir *E. coli* sejteket 50 ml SOB tápoldatban  $OD_{600} = 0,4-0,6$ -ig növesztettem 22°C-on, ezt követően a kultúrákat 10 percig jégen hűtöttem, majd 3.000 g-n, 4°C-on 10 percig centrifugáltam. Az összegyűlt sejteket jégen tartva 20 ml TB pufferben felfuszpendáltam, és újra 3.000 g-n, 4°C-on 10 percig centrifugáltam. A sejteket 5 ml TB pufferben felfuszpendáltam, 300 µl DMSO-t adtam a sejtsuszpenzióhoz, amit ezután 10 percig jégen inkubáltam. Ezt követően 100 µl-enként, előre lehűtött Eppendorf csövekbe szétosztva, folyékony nitrogénben fagyasztottam le a kompetens sejteket, majd -80°C-on tároltam őket (Inoue és mtsai., 1990).

TB puffer: 250 mM KCl, 55 mM  $MnCl_2$ , 10 mM PIPES, 5 mM  $CaCl_2$ , pH = 6,7.

## 7. Kémiai transzformálás

10 µl transzformálandó DNS-t, jégen felolvasztott *E. coli* kompetens sejthez (100 µl) adtam, melyet ezután 30 percig jégen tartottam. Hőshokot (45 másodperc, 42°C) követően a sejtekhez 890 µl SOB-ot adtam, 1 órán keresztül 37°C-on rázattam, végül a megfelelő antibiotikummal kiegészített LB lemezre szélesztettem.

SOB tápoldat: 20 g/l tripton, 5 g/l élesztő kivonat és 0,5 g/l NaCl.

## 8. Különböző hidrogenáz mutánsok elkészítése

### 3. Táblázat: A klónozások során használt oligonukleotidok megnevezése és szekvenciája

A klónozások során használt oligonukleotidok	
Név	5'→3' szekvencia
hupOupFw	GCATAAGAATTCATCAAGCCCCGCTGCTGC <i>EcoRI</i>
hupOupRev	TTATGGTCTAGAACGCGTCCCGAAAGCGAGCATCTC <i>XbaI</i>
hupOdownFw	AAGTGGACGCGTGAGACTCCGGCATGAGC <i>MluI</i>
hupOdownRev	TATGCCAAGCTTGCACCGCGGCGACCCTGT <i>HindIII</i>
hupOcompFw	ATGACCACACCGATAGACCT
hupOcompRev	CATTCGTTGGATTTCGTTCT
RehoxIFw	ACGTCATATGAAAGAGCAGGAAATCGACAG <i>NdeI</i>
RehoxIRev	TTGACTGCAGACCCCGTCCCCTCCCCCCCG <i>PstI</i>

#### Helyspecifikus *hupO* deléciós mutáns törzsek elkészítése

A *hupO* gén sejtben betöltött szerepének meghatározásához a leolvasási keretet nem sértő deléciós mutánsokat készítettem. A *T. roseopersicina* genomban a mutagenizálandó gén előtt és után elhelyezkedő 1000-1000 nukleotid hosszúságú homológ szakaszt építettem be pK18*mobsacB* plazmidba. A hupOupFw-hupOupRev primerpárral amplifikáltam a *hupO* gén előtti régiót, majd a tisztított PCR terméket *EcoRI-XbaI* restrikciós endonukleázokkal történő emésztés után pK18*mobsacB* vektorba ligáltam, amely a pKhupOup plazmidot eredményezte. A gén utáni régiót hupOdownFw-hupOdownRev oligokkal sokszorosítottam, a *MluI-HindIII* restrikciós enzimekkel kezelt fragmentet a pKhupOup plazmidba építve készítettem el a pKhupOD plazmidot, amely tartalmazta a *hupO* génben mutáns törzs elkészítéséhez szükséges szekvenciát. A pKhupOD plazmidot először *E. coli* S17-1  $\lambda$  pir törzsbe transzformáltam, majd *T. roseopersicina* GB11 és GB1131 törzsekbe konjugáltam a korábbiakban leírt módon. Az egyszeres rekombináns telepeket kanamicinnel kiegészített

PCA táptalajon szelektáltam, majd a kiválasztott kolóniákat antibiotikum-mentes tápoldatban növesztettem fel. A másodlagos rekombinánsokat 3% szukrózt tartalmazó PCA lemezeken szelektáltam, mivel a *T. roseopersicina*-ba bejuttatott plazmid tartalmazza a *sacB* gént, melynek terméke a levánszukráz enzim, amely a sejt számára letális levánt képes előállítani szukrózból. A szukróz rezisztens, de kanamicin érzékeny kolóniák genotípusát PCR-rel és kapilláris szekvenálással ellenőriztem. A *hupO* génben mutáns GB11 törzs a HOD1, míg a GB1131 a HOD13 nevet kapták.

#### Komplementációs konstrukciót tartalmazó törzsek elkészítése

A *hupO* gén deléciója által okozott fenotípus specificitásának igazolása érdekében a mutáns törzsekbe visszajuttattam a vad típusú *hupO* gént *T. roseopersicina*-ban replikálódni képes expressziós vektoron. A komplementációs plazmid konstrukció elkészítéséhez a hupOcompFw-hupOcompRev oligonukleotid párral amplifikáltam a *hupO* gént. A pDSK6CrtKm plazmidot *EcoRI* enzimmal hasítottam, a túlnyúló vég feltöltése után pedig foszfátazzal kezeltem. Az amplifikált fragmentet kináz kezelés után a felnyitott plazmidba ligáltam. Ezt követően HOD1, valamint HOD13 *T. roseopersicina* törzsekbe konjugáltam a *hupO* gént tartalmazó plazmidot és kanamicint tartalmazó PCA táptalajon növesztettem őket. Az így kapott kanamicin rezisztens kolóniák a HOD1comp és a HOD13comp törzsek klónjai.

#### *hoxI* inszerciót tartalmazó törzsek elkészítése

A *R. eutropha* citoplazmatikus hidrogenázának *hoxI* génjét RehoxIFw-RehoxIRev primerpár segítségével PCR-rel sokszorozítottam, a kapott terméket *NdeI*-*PstI* endonukleáz enzimekkel hasítottam, majd pDSK6CrtKm vektorba építettem be. A ligálást eredményező pDSKhoxI plazmidot konjugáltam különböző *T. roseopersicina* törzsekbe. A kanamicint tartalmazó PCA táptalajon felnőtt kolóniák tartalmazzák az expressziós plazmidot.

## 9. RNS-sel végzett munkák

### RNS tisztítás

Az RNS izoláláshoz a *T. roseopersicina* sejteket 50 ml folyadékban anaerob körülmények között növesztettem. A növekedés több fázisában 8 ml (4 g/l tiosulfátot tartalmazó PC tápoldaton történő növesztéskor) vagy 12 ml (1 g/l tiosulfátot tartalmazó PC tápoldat alkalmazásakor) sejtet centrifugáltam (3.750 g, 15 perc). A csapadékot ezután 400 µl SET pufferben szuszpendáltam fel, majd 350 µl SDS puffert adtam hozzá. Az elegyet óvatosan homogenizáltam, majd 500 µl telített 5M NaCl oldatot adtam hozzá. Ezt követően a mintákat 17.000 g-n 10 percig centrifugáltam, majd a tiszta felülúszót előkészített Eppendorf csőbe pipettáztam át. Az RNS-t a mintatérfogat 70%-ának megfelelő mennyiségű 2-propanollal csaptam ki, majd 20 percen át 17.000 g-n centrifugáltam. A felülúszó leöntését követően a csapadékot 1ml 70%-os alkohollal mostam kétszer, majd 2 percen át 17.000 g-n centrifugáltam. A felülúszó eltávolítását követően az RNS-t beszárítottam, majd 35 µl RNáz-mentes desztillált vízben vettem fel.

SET puffer: 20 % szukróz, 50 mM EDTA (pH=8,0), 50 mM Tris-HCl (pH=8,0).

SDS puffer: 20 % SDS, 1 % (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH=4,8.

### DNáz kezelés

Az RNS mintákat 10x DNáz I Reakció Puffer (Fermentas) és 1 U/µl RNáz-mentes DNáz I enzim (Invitrogen) jelenlétében 30 percig inkubáltam szobahőmérsékleten. A reakciót 5 mM végkoncentrációjú EDTA (Fermentas) hozzáadásával, 65°C-os 10 perces hőkezeléssel állítottam le.

### RNS minták mennyiségi és minőségi ellenőrzése

Az RNS minták mennyiségének és minőségének pontos meghatározásához Agilent 2100 típusú Bioanalyzer készüléket és a gyártó által ajánlott reagenseket használtam.

### Reverz transzkripció

A cDNS készítéshez Superscript VILO MasterMix-et (Invitrogen, Life Technologies, USA) alkalmaztam random hexamer primerekkel. A protokollnak megfelelően 1 µg DNáz I kezelt totál RNS-t használtam templátként. Az mintákat 25°C-on 10 percig, majd 42°C-on 60 percig inkubáltam, végül 85°-on 5 perces hőkezeléssel zártam a reakciót.

### Reverz transzkripció kapcsolt valós idejű kvantitatív PCR (RT-qPCR)

A kvantitatív PCR reakciókat ABi StepOne Plus készülékben végeztem. 96 lyukú plate-t használtam 20 µl mintatérfogattal. Minden mintából három párhuzamost készítettem, illetve templát nélküli kontrollokat (NTC), ahol vizet pipettáztam cDNS helyett a reakcióelegybe. A reverz transzkripcióval készített cDNS szolgált templátként a kvantitatív PCR során, melyben a *hupO* génre specifikus hupOqFw és hupOqRev, valamint a HupSL hidrogenáz nagy alegységének *hupL* génjére specifikus hupLqFw és hupLqRev oligonukleotidokat használtam. A reakcióelegyet a következőképpen mértem össze: 10 µl 2x Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 1,75 µl forward és reverz primer (1 pM/ µl), 4,5 µl nukleáz-mentes víz és 2 µl cDNS. A következő programot alkalmaztam: 50°C 2 perc, 95°C 2 perc; majd 45 ciklusban 95°C 15 másodperc és 60°C 1 perc. Az olvadási pont meghatározáshoz 95°C 15 másodperc, 60°C 1 perc inkubálás közben 0,5°C-onként történt detektálás. Az abszolút kvantifikációhoz kalibrációs görbét készítettem a gének PCR termékeinek tízes léptékű hígítási sorozatával: 0.0001-10 ng/µl koncentráció-tartományban.

#### **4. Táblázat: RT-qPCR reakciókhoz szükséges oligonukleotidok**

A kvantitatív PCR reakció során használt oligonukleotidok	
Név	5'→3' szekvencia
hupOqFw	CGATCCGATCCAAAAACATC
hupOqRev	GCATCGGGTTAACGTCAAAG
hupLqFw	CCTCGAAGAATCTGCTCCTG
hupLqRev	GAATACTTGGCCTGCTCGTC

## 10. Transzkriptom analízis

A transzkriptom analízishez 4 napos baktérium kultúrákból tisztítottam RNS-t. A 4 napos *T. roseopersicina* kultúrák a növekedés exponenciális fázisának végén lévő, frissen felnőtt sejtenyészetek, melyekből megfelelő mennyiségű és magas minőségű RNS tisztítható.

Az mRNS minták teljes transzkriptom analízise Life Technologies SOLiD V4 típusú új generációs szekvenáló készüléken történt a gyártó cég által javasolt reagensek felhasználásával. A SOLiD rendszer lehetőséget biztosít a gyöngyökhöz kötött, több millió DNS fragment szekvenciáinak egyidejű meghatározására.

A szekvenálási módszer fluoreszcens festékkel jelölt oligonukleotidok egymást követő ligálásán alapul. A vizsgálni kívánt törzsekből két párhuzamos leoltást készítettem, a négy napos sejt kultúrákból tisztított RNS mintákat szekvenáltuk meg. Minden adott törzsből elkészült két biológiai párhuzamos szekvenálási eredménynek köszönhetően tudtam kiszámolni az eredmények szórását.

A szekvenálás során mintánként 20-22 millió leolvasás készült, átlagosan 50 nukleotid hosszal, amelyeket CLC Genomics Workbench 5.1 szoftverrel, 55-60%-os hatékonysággal illesztettem a *T. roseopersicina* nyers genomszekvenciájára.

## 11. Sejtek feltárása szonikálással

50 ml Hypo Vial üvegekben felnevesztett kultúrákat 17000 g-n centrifugáltam, 4°C-on, 10 percig, ezt követően 2 ml 20 mM kálium-foszfát pufferben (pH = 7,0) szuszpendáltam fel őket. A sejteket szonikálással tártam fel (Hielsche, VailTweeter UIS250v, 90%-os amplitudó, 2\*2 perc időtartam). A szonikálás utáni szuszpenziót 17000 g-n centrifugáltam 4°C-on, 10 percig. A felülúszót Eppendorf csövekbe pipettáztam és -20°C-on tároltam. Ezt a sejtextraktumot használtam az *in vitro* aktivitásmérésekhez, valamint a fehérje munkákhoz.



## 12. Hidrogenáz aktivitásmérések

### In vivo hidrogéntermelés mérése

A baktérium törzseket 50 ml, 5  $\mu$ M NiCl<sub>2</sub> tartalmú Pfennig féle tápoldatban, 100 ml-es Hypo Vial üvegekbe oltottam le, 10 percig nitrogén gázzal anaerobizáltam a lezárt üvegeket, majd a növesztés különböző időpontjában a gáztérből 50  $\mu$ l mintát vettem Hamilton fecskendővel és gázkromatográfba fecskendeztem. A baktérium törzseket tartalmazó üvegek légtéréből vett minták H<sub>2</sub> tartalmát gázkromatográfval detektáltam (Agilent Technologies 7890A). Az egyes törzsek *in vivo* hidrogenáz aktivitás eredményeit az egyes sejt kultúrákra meghatározott optikai denzitás (OD) értékekkel normalizáltam. Öt biológiai ismétlés készült az aktivitásmérésekből.

### In vivo hidrogénfelvevő aktivitás mérése

A baktérium törzseket 100 ml-es Hypo Vial üvegekben 50 ml tápoldatba oltottam le. A 10 perces anaerobizálást követően 1 ml tiszta H<sub>2</sub>-t (89,1  $\mu$ mol H<sub>2</sub>) fecskendeztem a légtérbe. A növekedés minden napján gázkromatográfval mértem a légtér hidrogéntartalmát, a H<sub>2</sub> visszavevő aktivitást a kiindulási és az aktuális hidrogéntartalom arányából számoltam ki.

### In vitro hidrogéntermelés mérése

A mérésekhez használt mintát a fent részletezett módon, 50 ml *T. roseopersicina* kultúrából készített sejtextraktum jelentette. A reakcióelegyet 5 ml-es Hypo Vial üvegben mértem össze. 0,2 ml sejtfrakcióhoz 40  $\mu$ l 40 mM-os metilviologént (20 mM kálium-foszfát pufferben feloldva (pH = 7,0)) adtam majd 20 mM káliumfoszfát pufferrel (pH = 7,0) egészítettem ki az elegyet 2 ml-es végtérfogatra. A Hypo Vial üvegeket lezárásuk után 5 percig nitrogénnel anaerobizáltam, majd 100  $\mu$ l 50 mg/ml koncentrációjú nátrium-ditionit oldatot fecskendeztem be, ezzel redukálva el az összes metil-viologént, ami így elektrondonorként működött. A mintákat 60°C-on inkubáltam, majd 1 óra elteltével gázkromatográfval mértem a termelt hidrogén mennyiségét.

### In vitro hidrogén felvevő aktivitás detektálása spektrofotométerrel

A spektrofotometriás vizsgálatokhoz használt küvetákba az egyes törzsekből származó sejtextraktumból 100 µl-t használtam, melyet 20 mM kálium-foszfát pufferrel (pH = 7,0) egészítettem ki 2 ml-re, majd 40 µl 40 mM benzil-viologén oldatot adtam a reakcióelegyhez. A küveták (SubaSeal rubber stopper-rel történő) lezárása után a mintákat 5 percig nitrogén gázzal, majd újabb 5 percig hidrogén gázzal fúvattam át, majd a spektrofotométerben 60°C-on inkubáltam őket a kék szín megjelenéséig, amely a benzil-viologén redukálódását jelenti. A reakcióban a színintenzitás változás sebessége arányos a különböző törzsek hidrogén felvevő aktivitásával, melyet így a használt redox festék elnyelési hullámhosszán, 600 nm-en lehetett nyomon követni.

## **13. Fehérjékkal végzett munkák**

### Denaturáló poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE)

A kísérletekhez használt sejt extraktumok összfehérje tartalmát spektrofotométerrel határoztam meg (NanoDrop® Spectrophotometer ND-1000). Minden minta esetében 50 µg összfehérjét tartalmazó sejt extraktumot használtam. A mintákat 5xSDS felvivő puffer hozzáadása után 10 percig 95°C-on inkubáltam. A fehérjeminták analíziséhez 4-12% Bis-Tris Plus (Novex® by Life Technologies) előre öntött gélt alkalmaztam. A poliakrilamid gélek futtatása 1xMOPS SDS Running Buffer-ben (Novex® by Life Technologies) történt 100V feszültség mellett 2 órán keresztül.

5xSDS minta felvivő puffer: 250 mM Tris-HCl pH=6,80, 10% SDS, 50% glicerín, 20% β-merkaptóetanol, 0,1% Coomassie Brilliant Blue G250.

### Western hibridizáció

A fent részletezett módon poliakrilamid gélelektroforézissel elválasztott fehérje sávokat nitrocellulóz membránra (Nitrocellulose Membranes, 0,2 µM, Bio-Rad) blottoltam 10 mV-on egy éjszakán keresztül transzfer pufferben. A hibridizációs lépések között minden esetben 3x5 percig TBST pufferben mostam a membránt. Blottolást követően a membránt egy órán át blokkoló oldatban tartottam, ezzel megakadályozva a nem-specifikus fehérjék membránhoz való kötődését. Az anti-HupL és az anti-HoxI elsődleges ellenanyagokat

1:10000 arányban hígítottam blokkoló pufferben, melyben egy órán át inkubáltam a membránt. Az anti-HupL elsődleges ellenanyagot Dr. Qing Xu, JCVI, USA, míg az anti-HoxI ellenanyagot Dr. Oliver Lenz, Humboldt Egyetem, Berlin bocsátotta a rendelkezésünkre. A másodlagos ellenanyagot (goat-anti-rabbit HRP H+L) 1:5000-es hígításban alkalmaztam TBST pufferben egy órán keresztül. A detektáláshoz az enhancer és peroxid 1-1 ml-es elegyét (Millipore) mértem rá a membránra, majd a kemilumineszcens LICOR C-DiGit Blot Scanner készüléket használtam az előhíváshoz. Az eredmények értékelését az Image Studio Lite software segítségével végeztem.

Az egyes mintákból felvitt fehérjemennyiségek ellenőrzéséhez a nitrocellulóz membránt Ponceau festékekkel megfestettem.

Transzfer puffer: 14,4 g/l glicin, 3,025 g/l Tris és 5% etanol.

TBST puffer: 3% NaCl, 0,05% Tween20 és 10mM Tris-HCl, pH = 7,4.

Blokkoló puffer: 5% Blotting-Grade Blocker (Bio-Rad) feloldva TBST pufferben.

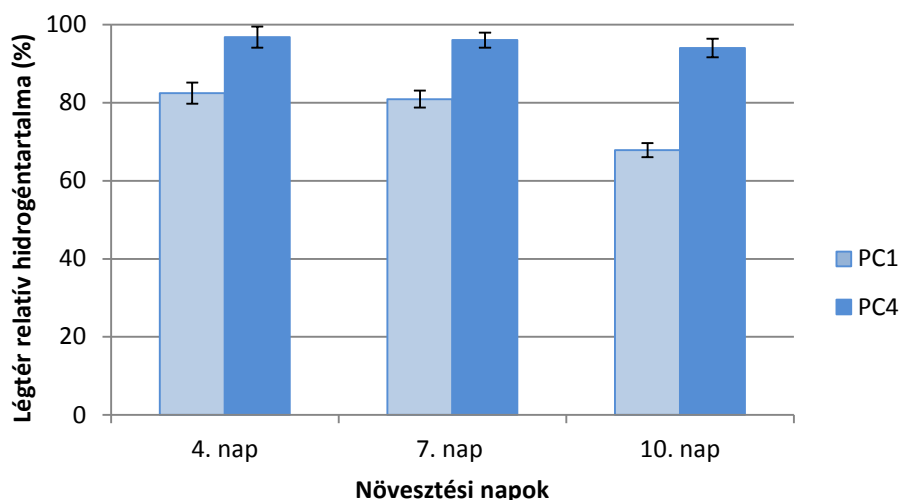
Ponceau festék: 0,1% Ponceau S 5%-os ecetsavban.

## VI. EREDMÉNYEK

### 1. Az újonnan azonosított HupO a HupSL negatív regulátora

#### 1. 1. HupSL hidrogenáz tioszulfát függő *in vivo* aktivitása

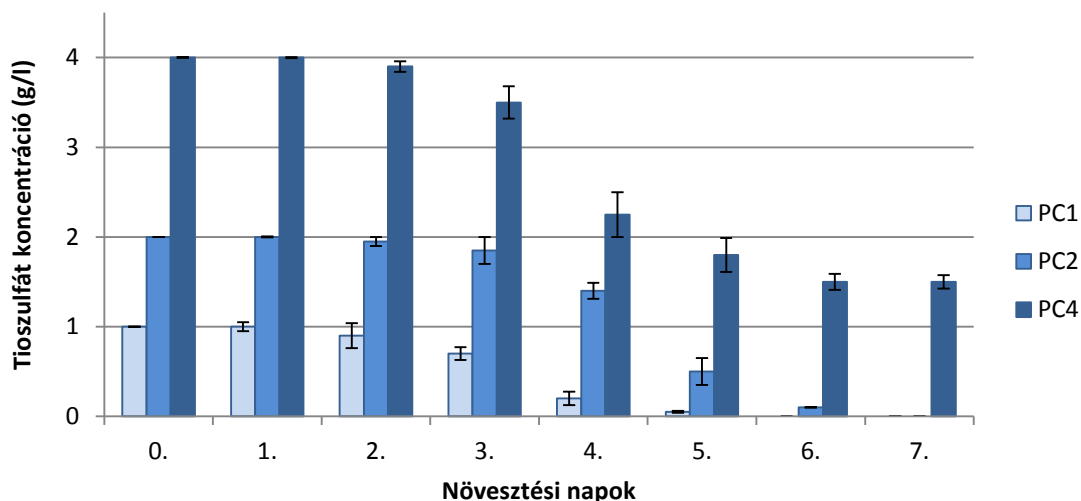
A HupSL membránkapcsolt hidrogenáz a *T. roseopersicina* fő energiakonzerválásra képes hidrogenáz enzime, amely molekuláris hidrogén, mint elektron- és energiaforrás felvételére képes. A Szegedi Tudományegyetem Biotechnológiai Tanszéken korábban előállított  $\Delta hynSL$ ,  $\Delta hox1H$  törzsben (GB1131) szelektíven vizsgálható a HupSL hidrogenáz *in vivo* hidrogén felvevő aktivitása, mivel ebben a törzsben csak a HupSL és a Hox2 hidrogenázok vannak jelen aktív formában. A Hox2 hidrogéntermelő hidrogenáz rendkívül alacsony aktivitásához glükózzal kiegészített tápoldatra van szükségük a sejteknek (PC2G tápoldat: 5 g/l glükóz) (Maróti és mtsai., 2010). A korábbi eredményekkel összhangban (Palágyi-Mészáros és mtsai., 2009) jelentős különbséget tapasztaltam a HupSL hidrogenáz  $H_2$  visszavevő aktivitásában, valamint a *hupSL* génnek expressziós szintjében egyaránt a tápoldatban lévő tioszulfát koncentrációjának függvényében. A leoltás után közvetlenül tiszta hidrogén gázt (89,1  $\mu\text{mol } H_2$ ) fecskendeztem a kultúra feletti anaerob légterbe. Növekedésük során a sejtek ezt a hidrogént tudták különböző mértékben hasznosítani. A HupSL aktivitás fordított arányban áll a tioszulfát mennyiségével, a tioszulfát koncentráció csökkentésével (4 g/l-ről 1 g/l-re) szignifikáns növekedés figyelhető meg a visszavett hidrogén mennyiségében GB1131 törzs esetében. 4 g/l tioszulfátot alkalmazva a hidrogén visszavevő aktivitás minimális (a kiindulási  $H_2$  95%-a jelen volt a légterben még a 10. növesztési napon is), míg 1 g/l tioszulfát esetében a GB1131 törzs szignifikáns hidrogén visszavevő aktivitást mutatott (hét nap után a leoltáskor hozzáadott hidrogén 80%-a volt a légterben, a 10. növesztési napra ez 68%-ra csökkent (6. ábra). A *hupSL* génnek expressziója szintén az alkalmazott tioszulfát koncentrációval van összefüggésben és teljesen független attól, hogy jelen van-e  $H_2$  a légterben a növekedés során vagy sem (Kovács és mtsai., 2005).



**6. ábra: GB1131 törzs *in vivo* hidrogén felvevő aktivitása PC1 és PC4 tápoldaton növesztve**

100%-nak tekintettem a leoltás követően a légtérbe injektált hidrogén mennyiségét.

A tioszulfát, mint elsődleges elektrondonor szükséges a sejtek növekedéséhez. A tápoldatban lévő tioszulfátot a növekedés korai szakaszában elkezd hasznosítani a baktérium, a tioszulfát fogyasztásának üteme a különböző tápoldatok alkalmazásakor eltérő. Mint azt már korábbi eredmények alátámasztják, a kezdeti 4 g/l tioszulfát nem fogy el teljesen a tápoldatból még akkor sem, amikor a sejtek már stacioner fázisban vannak. Ezzel szemben a kezdeti 2 g/l tioszulfátot a növesztés 7. napjára teljes mértékben felhasználja a baktérium (Maróti és mtsai., 2010). Az általam alkalmazott 1 g/l koncentráció esetében a leoltástól számított ötödik napra elfogy a tioszulfát a tápoldatból, míg a 4 g/l kiindulási koncentrációból a növesztés hetedik napján 1,5 g/l tioszulfát volt mérhető. A frissen leoltott baktérium kultúrák a második napon kezdik el a tápoldatban található tioszulfátot hasznosítani koncentrációtól függetlenül (7. ábra).



7. ábra: Tioszulfát fogyása a tápoldatból a növesztés során GB1131 törzsben  
PC1, PC2 és PC4 tápoldatokat használva

## 1.2. Korábban ismeretlen *hupO* gén azonosítása a *hupSL* génklaszterben

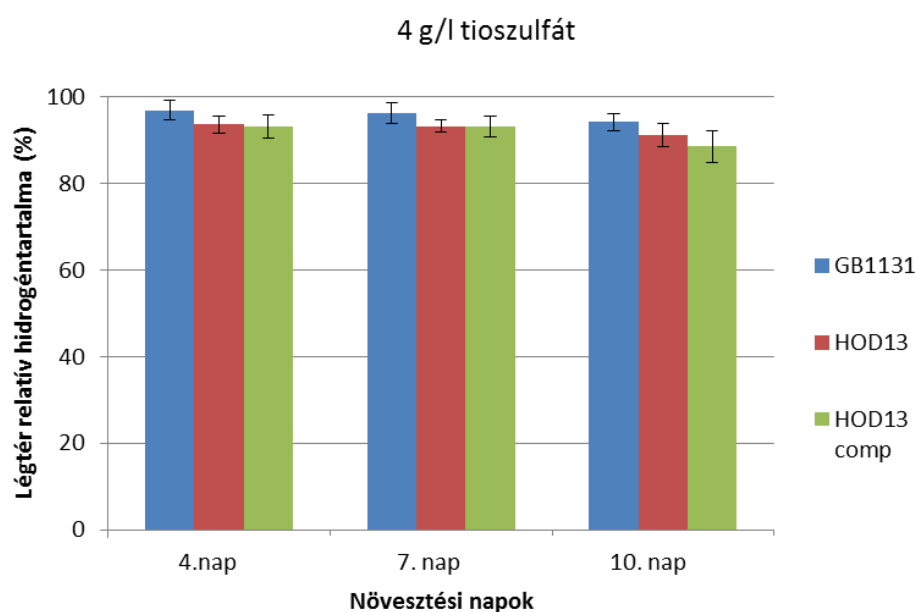
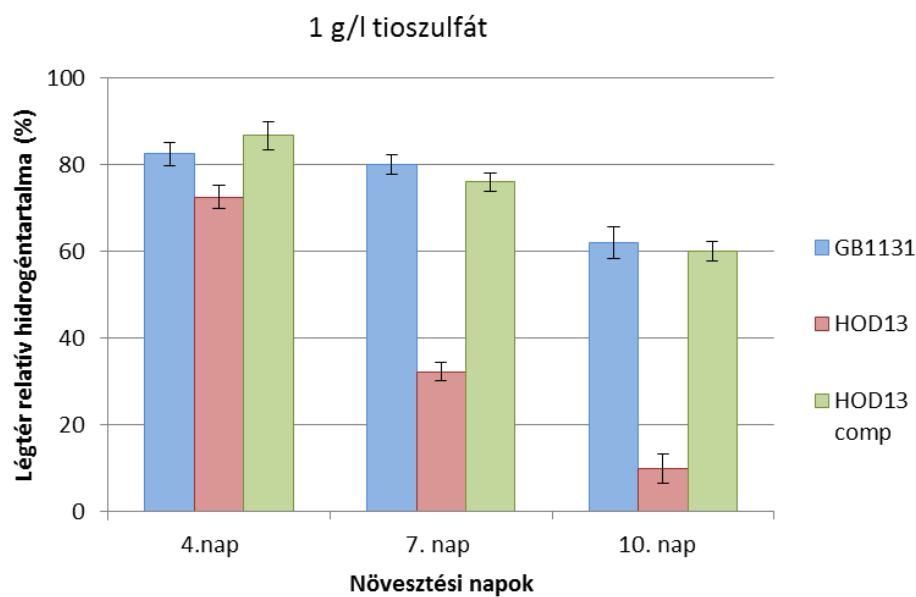
A *hupSL* operon a korábbi annotáció alapján a *hupSLCDHIR* génekből épült fel. Részleges újraszekvenálás és új annotáció után valószínűsíthető volt, hogy a *hupI* és *hupR* gének között található nyitott leolvasási keret (*orf*) egy valós gént reprezentál, azonban a génről képződő potenciális termék funkciója ismeretlen. A *hupI* gén egy rubredoxin típusú fehérjét kódol, amely feltételezhetően a HupSL hidrogenáz kis alegységének (HupS) érésében játszik szerepet. A HupR válasz regulátor fehérje esszenciális a *hupSL* gének transzkripciójához. Az NCBI nemzetközi adatbázisban található legutóbbi feltöltés alapján (GenBank Accession No.: GI:202 5764683) az általunk vizsgált *orfI* 432 nukleotid hosszúságú – 143 aminosavat kódoló – génszakasz volt. Az újraszekvenálás eredményeként egy extra nukleotidot azonosítottunk a 175-ös pozícióban, amely egy stop kodon létrejöttét eredményezi. Az újonnan annotált rövidebb gén egy 57 aminosavból felépülő fehérjét kódol, ezt a *hupSL* operonban elhelyezkedő, a sejtben eddig ismeretlen feladatot ellátó fehérjét kódoló gént *hupO*-nak neveztük el. Nukleotid szinten végzett globális BLAST analízis eredményeként öt hasonló szekvenciát találtunk, amelyek minimum 75 %-os hasonlóságot mutattak a *hupO* génnel (8/a. ábra). Érdekességgént tapasztaltuk, hogy mind az öt homológ gén a *T. roseopersicina* genomjában található, más fajokban egyáltalán nem találtunk szignifikáns hasonlóságot mutató géneket. A *hupO* génhez legmagasabb hasonlóságot a Hox2 citoplazmatikus hidrogenáz fehérjéit kódoló operonban fordított (reverz) irányban

elhelyezkedő *hox2O* gén mutatja (85%). További nem annotált *hupO* homológ régiók találhatóak különböző *T. roseopersicina* operonokban. A HupO fehérjével magas szintű hasonlóságot mutató (HupO-szerű) feltételezhetően fehérjét kódoló génszakasz található a baktérium fotoszintetikus génklaszterében a *ppsR2* és a *bchP* gének között (*hupO-szerű\_1*); a karotinoid bioszintéziséért felelős operon elején, a *crtC* gén előtt (*hupO-szerű\_2*); a fénygyűjtő komplex elemeit kódoló operonban, az *astE* és egy feltételezhetően glutamát-cisztein ligázt kódoló gén között (*hupO-szerű\_3*); valamint a polihidroxialkán-sav (PHA) bioszintézisében résztvevő fehérjéket kódoló gének között, a *phaZ* és a NAD-függő epimerázt kódoló gének között (*hupO-szerű\_4*). A gének alapján származtatott fehérje szekvenciák hasonlóság alapú többszörös illesztése során magasfokú egyezés figyelhető meg a HupO és a HupO-szerű fehérjék között. Az azonosság értéke 75% a Hox2O fehérje esetében, míg 76% a HupO-szerű\_1, 46% a HupO-szerű\_2, 60% a HupO-szerű\_3 és 42% a HupO-szerű\_4 fehérje esetében a HupO-hoz viszonyítva. Egy erősen konzervált 12 aminosavból álló konszenzus szekvencia szakasz (FNILNRADSNR) figyelhető meg mind a HupO, a Hox2O és a HupO-szerű fehérjék aminosav szekvenciájában (8/b. ábra). Számos szabályozó fehérje szekvenciájában található meg ez a konzervált motívum, többek között a *Saccharomyces cerevisiae* ADR1 DNS-kötő transzkripciós faktor és a *Pseudomonas chlororaphis* MarR transzkripciós regulátor fehérjeiben (Braun és mtsai., 2013; Calderon és mtsai., 2014). A fent említett aminosav sorrendhez hasonló régió azonosítható a *Pseudoalteromonas undina* DNS felismerő RNS polimeráz sigma-70 faktor, valamint különböző baktériumokban lévő ABC transzporter és hipotetikus fehérjék szekvenciáiban.





növesztési naptól a 10. napig. A *hupO* gén hiányában alacsony tioszulfát koncentráció (1 g/l) mellett történő növesztéskor jelentősen megnőtt a HupSL aktivitása a HOD13 törzsben a GB1131 hidrogén-felvételéhez képest. A GB1131 a hozzáadott hidrogén maximum 20%-át képes felvenni hét nap alatt, míg ennyi idő alatt a  $\Delta hupO$  törzs (HOD13) a kiindulási hidrogén mennyiségének 65%-át hasznosította. A 10. növesztési napra a HOD13 szinte az összes kiindulási hidrogént visszavette és oxidálta a légtérből (PC1), ezzel szemben a GB1131 törzs csupán a 35%-át (9. ábra). Extrém alacsony tioszulfát koncentrációt alkalmazva (0,5 g/l) a légtérbe injektált hidrogén 100%-át felhasználta a HOD13 törzs 10 nap alatt. Magas tioszulfát koncentráción (4 g/l) történő növesztés esetében – amikor a GB1131 *in vivo* hidrogénfelvevő aktivitása is alacsony – nem tapasztaltam különbséget a *hupO* gént tartalmazó, valamint a  $\Delta hupO$  mutáns törzs aktivitása között (5-8% visszavétele).



**9. ábra: *In vivo* HupSL hidrogénfelvevő aktivitás PC1 és PC4 tápoldaton növesztett GB1131, HOD13 és HOD13comp törzsek**

100%-nak tekintettem a leoltás követően a légtérbe injektált hidrogén mennyiségét.

A homológ komplementáció elkészítéséhez a *T. roseopersicina crt* promóterét tartalmazó expressziós vektorba (pDSK6CrtKm) klónoztam a *hupO* gént. Az előállított HOD1comp és HOD13comp törzsekben a *hupO* gén expressziója teljes mértékben helyreállt, a HOD13comp a GB1131 törzsszel megegyező alacsony *in vivo* HupSL hidrogenáz aktivitást mutatott (9. ábra). Ezen eredmények ismeretében elmondható, hogy a GB1131 és a HOD13

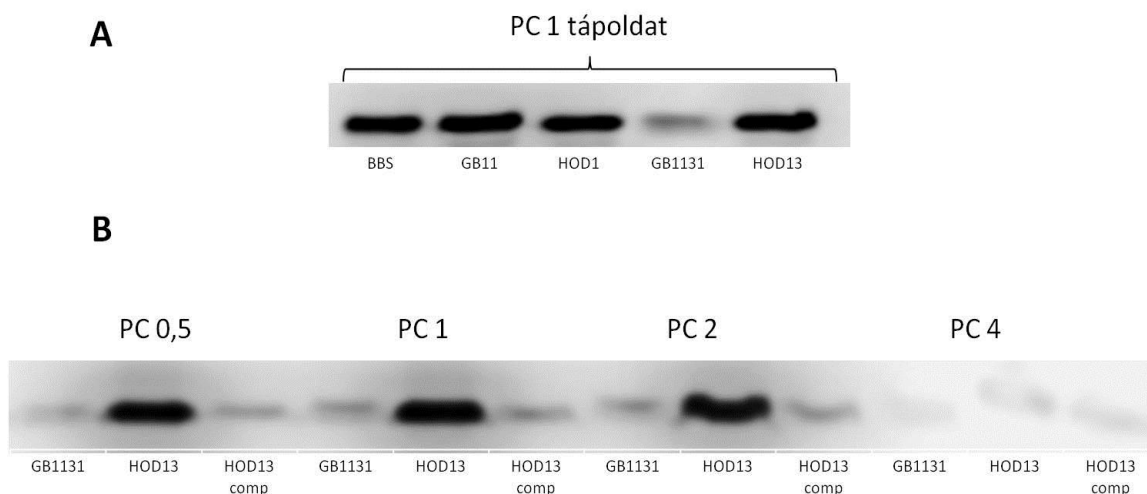
törzsek hidrogén felvevő aktivitásában megfigyelt különbséget kizárólag a *hupO* jelenléte illetve annak hiánya okozza.

Az *in vivo* mérések mellett *in vitro* hidrogén visszavételt is vizsgáltam hét napos kultúrákból készített sejt extraktumokon. Az *in vivo* eredményekkel összhangban jelentős különbség volt megfigyelhető a *hupO*-t tartalmazó (GB1131 és HOD13comp) valamint a  $\Delta hupO$  mutáns (HOD13) törzsek aktivitásában alacsony tioszulfát koncentrációjú tápoldat (PC1, PC2) alkalmazásakor. A HOD13 20-25%-kal magasabb *in vitro* hidrogén felvevő aktivitást mutatott a *hupO* gént tartalmazó törzsekkel szemben.

Tanulmányozva az alkalmazott törzsek növekedési sebességét szignifikáns különbséget tapasztaltam a különböző törzsek között alacsony tioszulfát koncentráción történő növesztéskor (1 g/l). 72 óra elteltével a GB1131 törzs 30%-kal alacsonyabb (+/- 7%) növekedési rátát mutatott, mint a  $\Delta hupO$  mutáns, amelynek a növekedési üteme a vad típusú *T. roseopersicina* (BBS) osztódási hatékonyságával volt megegyező. A GB11 és HOD1 törzsek növekedési sebessége kissé elmaradt a vad típustól (72 óra után 10-12%-kal alacsonyabb), azonban jóval gyorsabb volt, mint a GB1131 törzs osztódása. Ezek az eredmények előre jelezték a Hox1 hidrogenáz enzim kulcsszerepét.

A HupSL hidrogenáz aktivitás és a növekedési sebesség mellett elemeztem a *hup* gének transzkripciós aktivitását, valamint a Hup fehérjék expressziós értékeit hidrogén jelenlétében növesztett kultúrákon. A fehérjeszintű analízist Western-hibridizációs kísérletekkel végeztem, poliklonális anti-HupL antitestet alkalmazva, amellyel meghatároztam a HupL fehérje mennyiségét az általam vizsgált törzsekben (BBS, GB11, HOD1, GB1131, HOD13 és HOD13comp). A GB1131 esetében csekély HupL szintet tapasztaltam a BBS és a GB11 törzsek által mutatott fehérjeszinthez képest, amelyekben a Hox1 hidrogenáz aktív formában van jelen (10/a. ábra). Ez a jelenség arra enged következtetni, hogy (a sejt redox állapotán keresztül) a Hox1 kétirányú hidrogenáz képes szabályozni a HupSL hidrogenáz fehérjeszintézisét. A *hupO* gén, azaz a HupO fehérje hiánya a vad típusú törzsre jellemző HupL fehérje szintet eredményezi a  $\Delta hupO$  törzsben GB1131 háttéren is (HOD13). A Western analízis eredményei teljes mértékben korrelálnak az aktivitás tesztek során tapasztaltakkal, tehát jelentős növekedés figyelhető meg az érett HupL fehérje szintjében a  $\Delta hupO$  mutánsban a GB1131 törzshöz képest alacsony tioszulfáton (PC0.5, PC1 és PC2) történő növesztéskor (PC1 tápoldaton 10-15-szörös fehérjeszintézis). Ezzel szemben magas tioszulfát koncentrációt alkalmazva (4 g/l) mindkét törzs esetében (GB1131 és HOD13)

extrém alacsony HupL fehérjeszint volt tapasztalható (10/b. ábra). A Western hibridizációs vizsgálatokhoz használt membránokat az előhívást követően Ponceau festékkel megfestettem, így ellenőrizve az egyforma mennyiségű összfehérje felvitelét a gélre minden minta esetében.



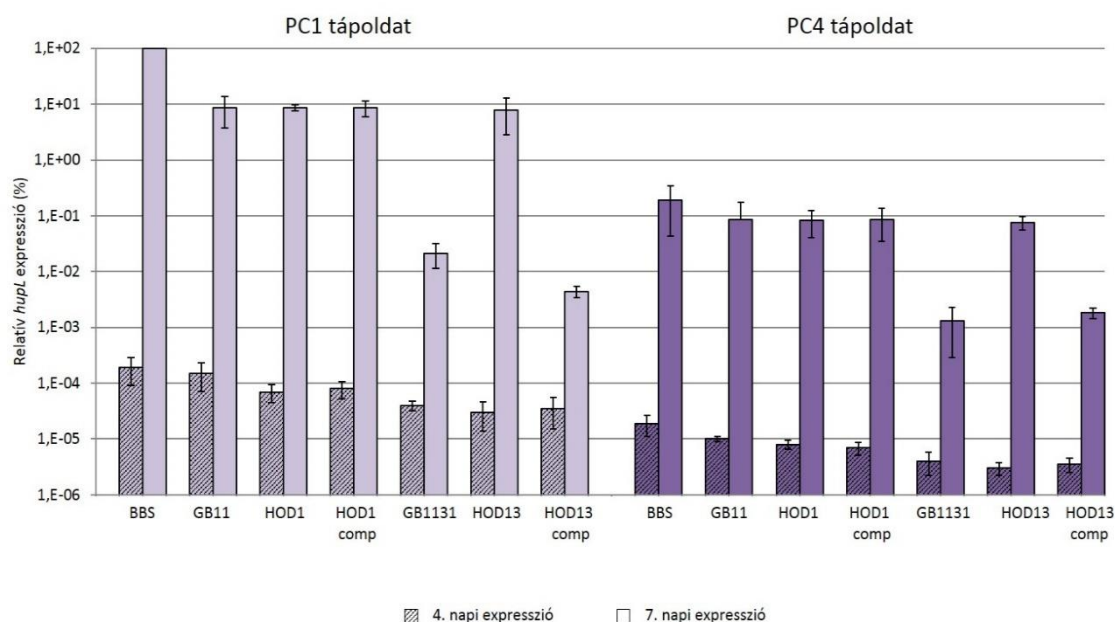
**10. ábra: HupL Western hibridizációs kísérlet**

**A:** BBS, GB11, HOD1, GB1131 és HOD13 törzsek PC1 tápoldaton növesztve

**B:** PC0,5, PC1, PC2 és PC4 tápoldaton alkalmazása mellett GB1131, HOD13 és HOD13comp törzsek

Az eddigiekhez hasonló mintázat volt megfigyelhető a *hup* struktúrgének transzkripció szintjében is. A már korábban alkalmazott törzsek (BBS, GB11, HOD1, GB1131, HOD13 és HOD13comp) *hupS* valamint *hupL* gének expresszió szintjét vizsgáltam PC1 (1 g/l) valamint PC4 (4 g/l) tápoldatokat használva. Az RNS tisztításhoz 4 és 7 napos kultúrákból vettem mintát. A növekedés korai szakaszában a 4 napos kultúrákból vett minták esetében a vizsgált gének transzkripció szintje csaknem nulla volt függetlenül a tápoldat tioszulfát koncentrációjától. A 7. növesztési napon vizsgált minták mindegyike jól detektálható transzkripció szintet mutatott. A BBS, a GB11, a HOD1 és a HOD13 törzsek esetében lényegesen magasabb génexpresszió volt megfigyelhető összehasonlítva a GB1131 és a HOD13comp törzsekkel, különösen 1 g/l tioszulfát koncentráció mellett. Több mint két nagyságrend különbség mérhető a *hupL* transzkripció szintjében a HOD13 és a GB1131 törzs között PC1 tápoldatot alkalmazva. Hasonlóan magas a *hupL* transzkript szintje a vad típusú, a GB11 és a HOD1 törzsekben, amelyek tartalmazzák a Hox1 citoplazmatikus hidrogenázt (11. ábra). A HupSL hidrogenáz kis alegységét kódoló *hupS* gén expresszió

vizsgálata a *hupL* gén expressziós analízisének eredményeivel azonos mintázatot mutatott a különböző *T. roseopersicina* törzsekben.

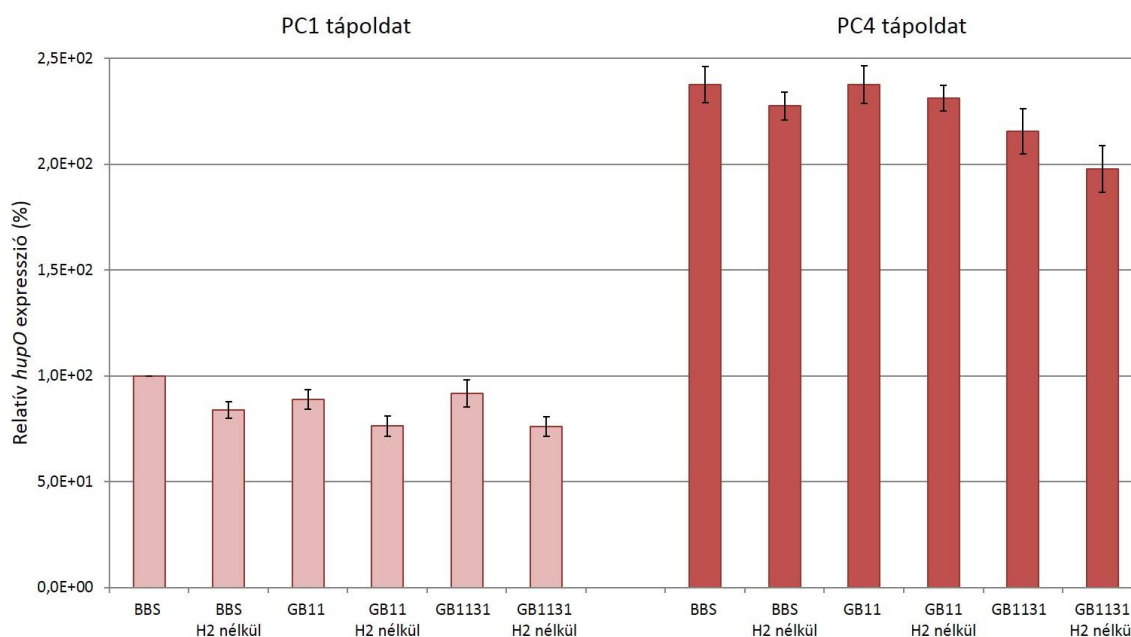


**11. ábra: A *hupL* gén transzkripció szintjének vizsgálata különböző *T. roseopersicina* törzsekben PC1 és PC4 tápoldaton nevelt 4 illetve 7 napos kultúrák esetében**

100%-nak tekintetem a 1 g/l tioszulfátot tartalmazó tápoldatban nőtt BBS törzsben mért génkifejeződést.

#### 1.4. A *hupO* gén transzkripció szintjének meghatározása

A *hupO* gén transzkripció szintjét komplett *hupSL* operont tartalmazó törzsekben (BBS, GB11 és GB1131) tanulmányoztam különböző növesztési körülményeket alkalmazva, de minden esetben hidrogén jelenlétében. A 4 napos sejtek (*hupO* gén esetében is) extrém alacsony expressziós szintje miatt a 7 napos kultúrákból vett minták transzkripció értékeit elemeztem. A *hupO* transzkript szintjét a tioszulfát koncentrációja kevésbé befolyásolta, mint a *hupSL* struktúrgénét, azonban kétszeres transzkripció szint volt megfigyelhető a PC4 tápoldatban növesztett sejtek esetében a PC1-ben nőtt kultúrák értékéhez képest. Továbbá nem befolyásolta a *hupO* gén átíródásának mértékét sem a légtérben lévő hidrogén megléte vagy annak hiánya, sem a Hox1 hidrogenáz jelenléte illetve hiánya (12. ábra).



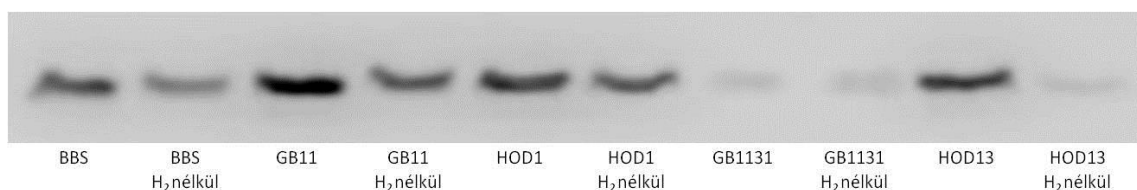
**12. ábra: A teljes *hup* génklasztert tartalmazó törzsek *hupO* gén expressziós analízise PC1 és PC4 tápoldatban, hidrogén jelenlétében, illetve hiányában növesztett kultúrák esetében**

100%-nak tekintetem a 1 g/l tioszulfátot tartalmazó tápoldatban nőtt BBS törzsben mért génkifejeződést.

### 1.5. Hidrogénfüggő HupSL expresszió a $\Delta hupO$ (HOD13) törzsben

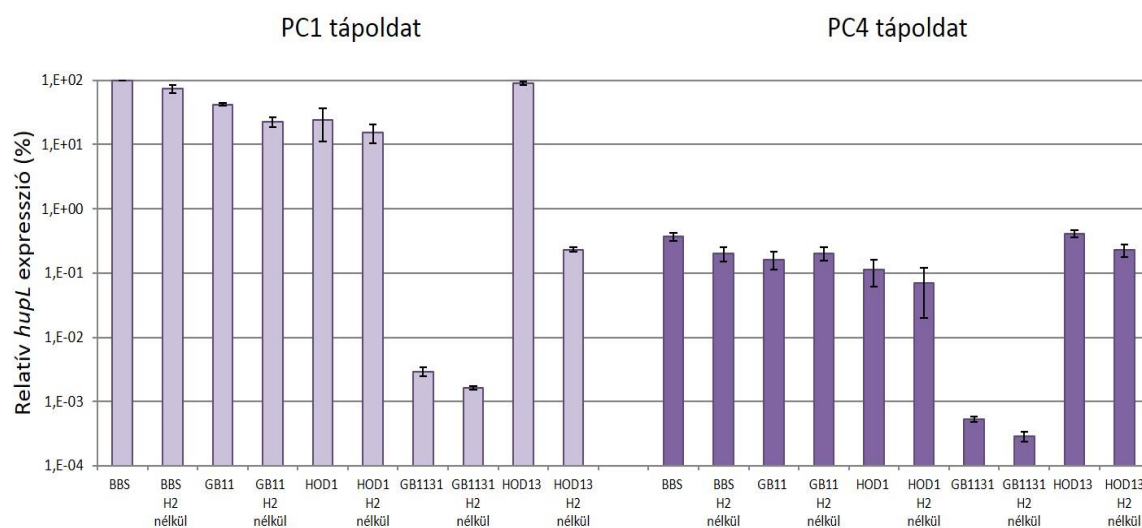
Korábbi vizsgálatok alapján elmondható volt, hogy a *T. roseopersicina* HupSL hidrogenáz gének expressziója a molekuláris hidrogén jelenlététől illetve hiányától függetlenül működik (Kovács és mtsai., 2005). Az újonnan elvégzett kísérletek eredményei teljes egészében korreláltak a korábban megállapított hidrogén-független expresszióval BBS, GB11 HOD1 és GB1131 törzsek esetében. A HOD13 ( $\Delta hynSL$ ,  $\Delta hox1H$ ,  $\Delta hupO$ ) törzs esetében azonban jelentős mértékű hidrogénfüggés volt megfigyelhető a sejtek HupSL fehérjeszintézisében alacsony tioszulfát koncentráció (1 g/l) alkalmazásakor (13. ábra). A BBS, GB11, HOD1, GB1131 és HOD13 törzsek HupSL expressziójának hidrogén-függésének vizsgálatához anti-HupL elsődleges ellenanyaggal Western analízist végeztem különböző tioszulfát koncentráción (1 g/l és 4 g/l) felnőtt 7 napos minták fehérje kivonatain. A leoltást követően az anaerob légtérbe tiszta hidrogén (89,1  $\mu\text{mol H}_2$ ) adásával vagy annak mellőzésével biztosítottam a megfelelő növesztési körülményeket. A GB1131 HupL szintézisét nem befolyásolta a hidrogén jelenléte vagy hiánya, ugyanakkor a HOD13 törzs HupL szintézise jelentős különbséget mutatott hidrogén mellett illetve hidrogén nélkül PC1 tápoldaton történő növesztéskor. A  $\Delta hupO$  mutáns törzs (HOD13) hidrogén jelenlétében történő növesztéskor szignifikánsan nagyobb mennyiségű HupL fehérjét szintetizált, mint

ugyanez a törzs hidrogén nélkül PC1 tápoldaton (csaknem hétszeres abszolút kemilumineszcencia értéket tapasztaltunk hidrogén hozzáadásakor) (13. ábra). Ez a hidrogén-függés nem volt megfigyelhető a Hox1 hidrogenázt tartalmazó (BBS, GB11 és HOD1) törzsek HupL szintézise esetében. Meg kell jegyezni, hogy habár a leoltáskor adtam a hidrogént a légtérbe, a mintavétel napján, azaz a 7. napon is tartalmazott az egyes törzsek esetében különböző mennyiségű H<sub>2</sub>-t a légtér. PC4 tápoldaton nevelt kultúrák minden esetben alacsony HupL fehérje szintet mutattak, amit a hidrogén jelenléte vagy hiánya csekély, nem szignifikáns mértékben befolyásolt csak.



**13. ábra: HupL hidrogén-függő szintézis vizsgálata Western hibridizációval**

A fehérje szinten végzett vizsgálatok eredményeivel összhangban a HOD13 törzs *hupSL* gének expressziós mintázatában is hidrogén-függés figyelhető meg. A GB1131 törzs minimális különbséget mutatott hidrogén jelenlétében illetve hiányában, mindkét körülmény között alacsony *hupSL* transzkripció szintet detektáltunk. Ezzel szemben a HOD13 (GB1131  $\Delta hupO$ ) törzsben a *hupSL* struktúrgének expressziója erősen hidrogén-függő volt főként alacsony tioszulfát koncentráció mellett (2,5 nagyságrenddel magasabb *hupL* expressziós érték a PC1 tápoldatban hidrogén jelenlétében nevelt HOD13 kultúra esetében a hidrogénmentes kultúrához képest) (14. ábra).



**14. ábra: A különböző *T. roseopersicina* törzsek *hupL* hidrogén-függő expressziós vizsgálata PC1 és PC4 tápoldat alkalmazásakor**

100%-nak tekintetem a 1 g/l tioszulfátot tartalmazó tápoldatban nőtt BBS törzsben mért génkifejeződést.

A hidrogénfüggés megállapításához alkalmazott törzsek sejtosztódási sebességét is vizsgáltam hidrogén jelenlétében és hiányában, azonban nem tapasztaltam hidrogénfüggő növekedésbeli különbséget egyik törzs esetében sem.

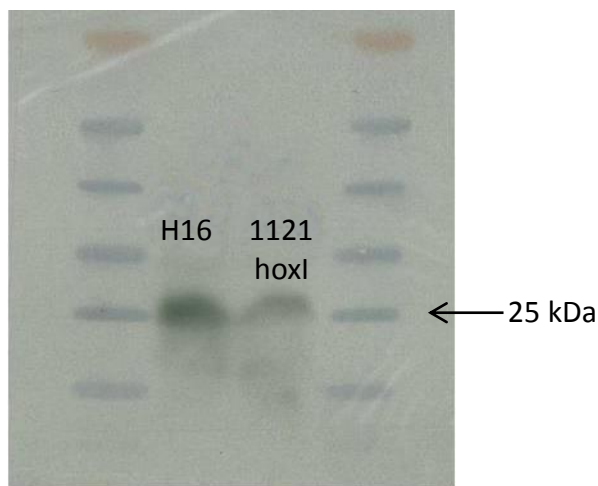


## 2. Heterológ HoxI fehérje hatása a Hox1 hidrogenázra

A *R. eutropha* kemolitotróf baktérium hat alegységből felépülő szolubilis hidrogenázzal rendelkezik (HoxFUYH<sub>2</sub>). A hidrogenáz (HoxY, HoxH) és diaforáz (HoxF, HoxU) alegységek mellett a HoxI dimer vesz részt az enzim felépítésében. A HoxI pontos funkciója nem ismert, feltételezhetően az elektrontranszportban vesz részt, mivel NADH-kötő hellyel rendelkezik (Burgdorf és mtsai., 2005). A *T. roseopersicina* Hox1 hidrogenázának hidrogenáz és diaforáz alegységei mellett azonosítottak egy ötödik alegységet, a Hox1E-t. Számos baktériumban, főként cianobaktériumokban (pl. *Synechococcus* sp.) a Hox-típusú hidrogenáz harmadik diaforáz alegysége a HoxE. A *T. roseopersicina* Hox1E sejtben betöltött szerepe nem teljesen tisztázott, jelentős homológiát mutat a NuoE NADH: ubikinon oxidoreduktázhoz és valószínűleg a HoxI-hez hasonlóan az elektrontranszportban vesz részt.

### 2. 1. HoxI fehérje heterológ expressziója *T. roseopersicina*-ban

A *R. eutropha* *hoxI* génjét tartalmazó heterológ expressziós konstrukció elkészítéséhez a *T. roseopersicina* *crt* promóterét tartalmazó expressziós vektorba (pDSK6CrtKm) klónoztam a gént, az így elkészült pDSK*hoxI* plazmidot *E. coli* sejtéből konjugálással juttattam a kiválasztott *T. roseopersicina* törzsekbe (GB1121, GB112141 és HoxEDM). Kontrollként a pDSK6CrtKm plazmidot tartalmazó törzseket használtam, melyek aktivitás és expressziós adatai minden esetben megegyeztek a plazmiddel nem rendelkező kiindulási törzsek értékeivel. A *hoxI* gén bejuttatásának sikerességét kétféle módszerrel ellenőriztem. Egyrészt PCR reakcióval a RehoxIFw-RehoxIRev primerpárral sokszorozítottam a *hoxI* gént a *T. roseopersicina* törzsek genomi DNS-én, kontrollként *R. eutropha* H16 vad típus genomi DNS-ét használva (Kortluke és mtsai., 1987). Másrészt oszlopkromatográfiával tisztított *T. roseopersicina* 1121*hoxI* ( $\Delta$ *hynSL*,  $\Delta$ *hupSL*, *hoxI*) kultúrából készült fehérje mintát Western analízissel hasonlítottam össze a *R. eutropha* sejt extraktumával (15. ábra).

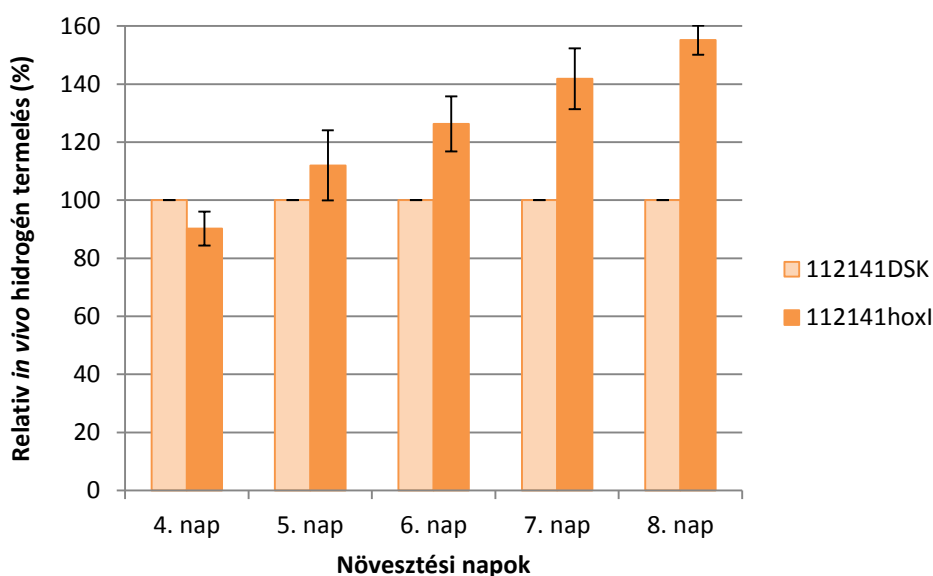


15. ábra: HoxI fehérje azonosítása *R. eutropha* H16 és *T. roseopersicina* 1121hoxI törzsekben

## 2. 2. HoxI hatása az *in vivo* Hox1 általi hidrogéntermelésre

A citoplazmatikus Hox1 hidrogenáz a fő tényező a *T. roseopersicina* fényen történő *in vivo* hidrogén termelésében abban az esetben, amikor a nitrogénáz enzim működése gátolt. A Hox1 hidrogéntermelő aktivitása fokozható a tápoldat tioszulfát koncentrációjának növelésével. A GB112141 ( $\Delta hynSL$ ,  $\Delta hupSL$ ,  $\Delta hox2H$ ) törzs csak a Hox1 hidrogenázt tartalmazza aktív formában, ezáltal alkalmas specifikusan ezen enzim aktivitásának szelektív vizsgálatára. A Hox1 hidrogenáz magas tioszulfát koncentráció mellett (minimum 4 g/l) a sejtben felhalmozott felesleges elektronokat hidrogén formájában pumpálja ki a sejtből a légterbe. A *R. eutropha* szolubilis hidrogenázának elektrontranszportért felelős fehérjéje, a HoxI jelenléte fokozza a Hox1 hidrogéntermelő aktivitását (16. ábra). A molekuláris hidrogén termelését a leoltást követő harmadik naptól gázkromatográffal követtem nyomon összehasonlítva a 112141DSK ( $\Delta hynSL$ ,  $\Delta hupSL$ ,  $\Delta hox2H$ , pDSK6CrtKm) és a 112141hoxI ( $\Delta hynSL$ ,  $\Delta hupSL$ ,  $\Delta hox2H$ , pDSKhoxI) törzsek aktivitását. A negyedik napon közel azonos volt a két törzs által termelt hidrogén mennyisége, az ötödik naptól kezdve viszont fokozatosan nőtt a különbség a hidrogén termelésében *hoxI* gént tartalmazó törzs javára. A 7-8. növesztési napra közel másfélszeres volt a 112141hoxI által termelt hidrogén mennyisége a légterben (16. ábra). Alacsony tioszulfát tartalmú tápoldaton történő növesztés esetében (PC1, PC2) azonban a *hoxI*-vel kiegészített törzs hidrogéntermelése nem éri el a Hox1 ezen körülmények között mutatott csekély hidrogéntermelő aktivitását sem. Hat napos kultúrákat vizsgálva a *hoxI* génnel kiegészített

törzs (112141hoxI) hidrogéntermelő aktivitása csupán 80%-a volt a *hoxI*-t nem tartalmazó, 112141DSK törzshöz viszonyítva PC1 és PC2 tápoldaton egyaránt.



**16. ábra: HoxI hidrogenáz *in vivo* hidrogéntermelő aktivitása 112141DSK és 112141hoxI törzsekben PC4 tápoldaton nevelve**

100%-nak tekintettem a 112141DSK törzs által termelt hidrogén mennyiségét az adott növesztési napon.

A HoxEDM ( $\Delta hynSL$ ,  $\Delta hupSL$ ,  $\Delta hoxIE$ ) *T. roseopersicina* törzs a *hoxIE* gén hiányában *in vivo* hidrogéntermelésre nem képes. A HoxI hidrogenáz *in vitro* hidrogenáz aktivitását nem befolyásolja a *hoxIE* gén delécioja (Rákhely és mtsai., 2004). Mivel a HoxI és a HoxIE fehérjék egyaránt az elektrontranszportban vesznek részt, feltételeztük, hogy a HoxI fehérje részben vagy teljes mértékben képes átvenni a HoxIE *in vivo* hidrogéntermelésben betöltött szerepét. A *hoxI* gén HoxEDM törzsbe történő bevitele azonban a HoxI hidrogéntermelő aktivitását sem *in vivo*, sem *in vitro* nem befolyásolta, azaz a HoxI jelenlétében sem volt képes a HoxEDM törzs *in vivo* hidrogéntermelésre.

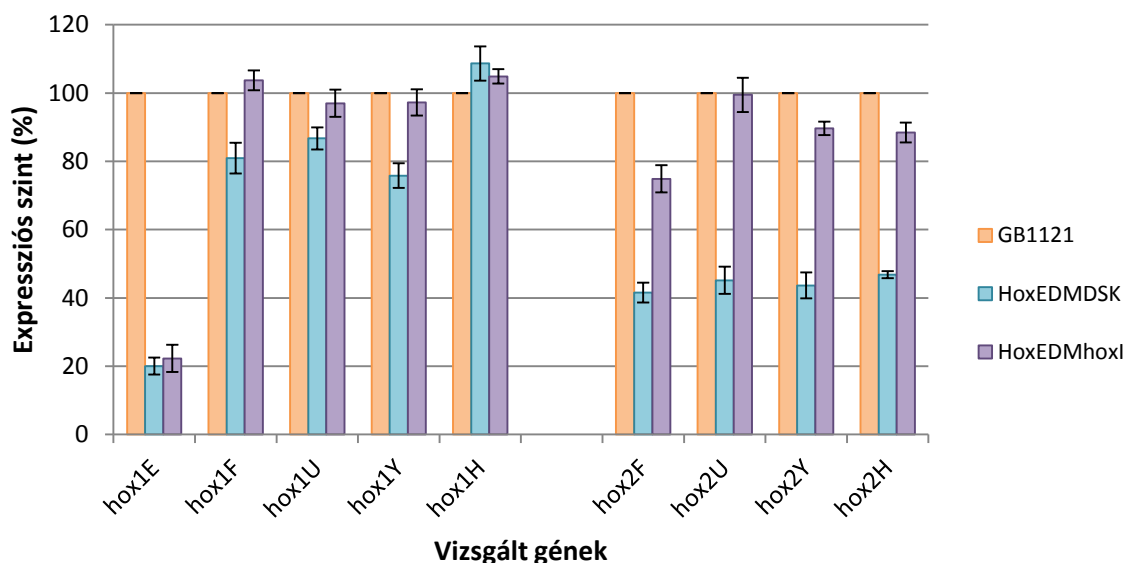
## 2. 3. Teljes transzkriptom analízis

Annak érdekében, hogy átfogó képet kapjunk arról, hogy a *hoxIE* valamint a heterológ *hoxI* gének jelenléte vagy hiánya mely további gének expresszióját befolyásolja, teljes transzkriptom analízist végeztünk a GB1121 ( $\Delta hynSL$ ,  $\Delta hupSL$ ), HoxEDM\_DSK ( $\Delta hynSL$ ,

$\Delta hupSL$ ,  $\Delta hox1E$ , pDSK6CrtKm) és a HoxEDMhoxI ( $\Delta hynSL$ ,  $\Delta hupSL$ ,  $\Delta hox1E$ , pDSKhoxI) törzseken. Az expressziós profil meghatározásához SOLiD V4 újgenerációs szekvenálási eljárást alkalmaztunk, az egyes génekre átlagosan 300x lefedettséget értünk el minden törzs esetében. Az RNS tisztítás négy napos, azonos (exponenciális) növekedési fázisban lévő PC4 tápoldatban növesztett baktérium kultúrákból történt. Két biológiai párhuzamos mintát használtam mindegyik törzs esetén.

A transzkriptom analízis eredményét elemezve elmondható, hogy összességében rendkívül kevés gén expressziós szintje változott meg a *hox1E* deléciója következtében a teljes *hox1* operont tartalmazó törzsben tapasztalt génexpressziós értékekhez képest, továbbá minden esetben génexpresszió csökkenést tapasztaltunk. A *hox1* gén bevitele a *hox1E* deléciós törzsbe a legtöbb csökkent transzkripciójú gén kifejeződését növelte és az eredeti értékre állította vissza. Összesen 2 csökkent expressziót mutató gén esetében nem tapasztaltunk komplementáló hatást a *hox1* gén bevitelét követően (NADH 5 homológ és a genomban közvetlenül mellette azonosított hipotetikus transzmembrán fehérje).

A *T. roseopersicina* szolubilis hidrogenázait kódoló gének (*hox1EFUYH*, *hox2FUYH*) expressziós mintázatát megvizsgálva a különböző törzsekben azt láthatjuk, hogy a *hox1E* hiányában különböző mértékben, de mindegyik *hox* gén expressziója lecsökken a HoxEDM\_DSK törzsben, kivéve a Hox1 hidrogenáz nagy alegységét kódoló *hox1H* gént, amely mindhárom törzsben azonos mértékben fejeződik ki (17. ábra). A *hox2* gének esetében ez a csökkenés drasztikusabb mértékű, hozzávetőleg 40 %-os expresszió csökkenés figyelhető meg a *hox1E* hiányában a GB1121 törzshöz viszonyítva (melyben aktív Hox1E működik). Érdekes módon a *hox1* gén bevitele a  $\Delta hox1E$  törzsbe részben vagy teljesen helyreállítja a *hox* gének expressziós értékeit. A *hox1* gének közel azonos kifejeződési szintet mutatnak a HoxEDMhoxI törzsben, mint a GB1121-ben. A Hox2 enzimet kódoló gének expressziójára is hatással van a *hox1* bevitele, a HoxEDM\_DSK-nál jóval magasabb, a GB1121 törzshöz viszonyítva átlagosan 70 %-os génexpressziós értékeket tapasztaltunk (17. ábra).



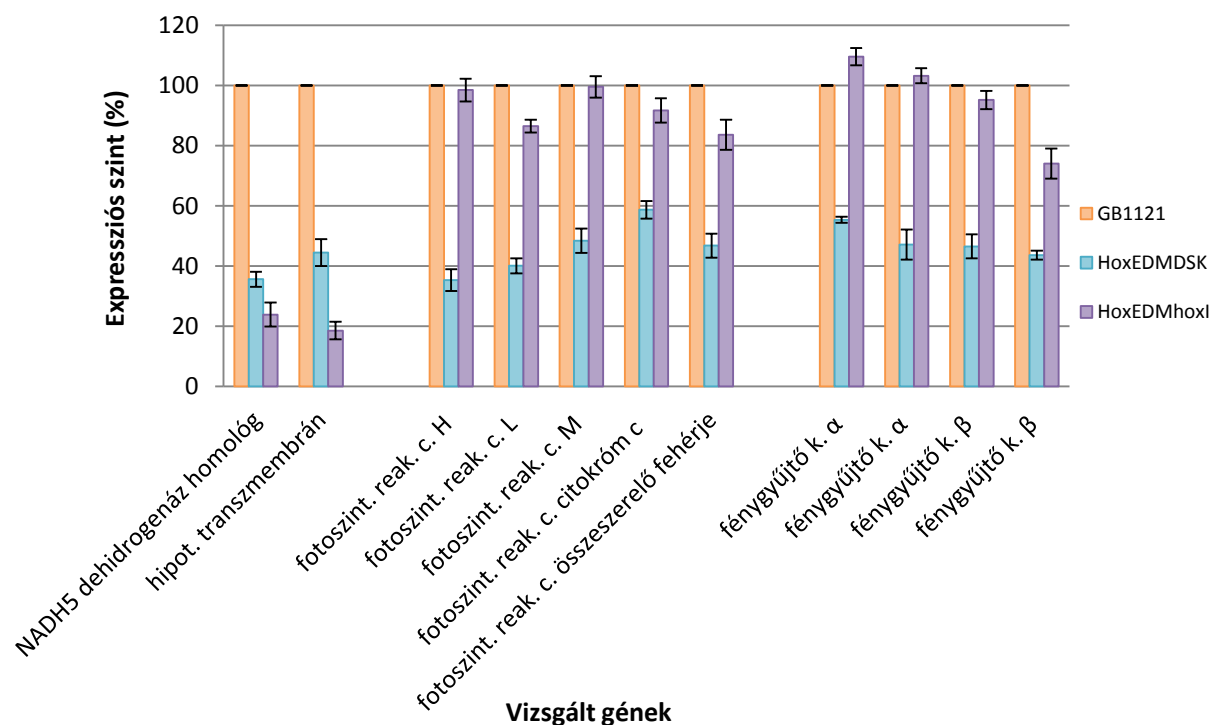
**17. ábra: *hox1* és *hox2* hidrogenáz gének expressziója a GB1121, a HoxEDM\_DSK és a HoxEDMhoxI törzsekben**

100%-nak tekintettem minden gén esetében a GB1121 törzsben tapasztalt génexpressziót.

A teljes transzkriptom analízis során további olyan géneket azonosítottunk, amelyek expressziós szintjét szignifikánsan befolyásolja a *hox1E* gén jelenléte illetve hiánya. A *hox* strukturális génekkel megegyező expressziós mintázat figyelhető meg a fotoszintetikus reakció központot, illetve a fénygyűjtő komplexet alkotó fehérjéket kódoló gének esetében. A fotoszintetikus reakcióközpont alegységeit kódoló gének a HoxEDM\_DSK törzsben 50 %-os transzkripció szintet mutatnak a GB1121, azaz a *hox1E*-t tartalmazó törzshöz viszonyítva. Ezzel szemben a heterológ HoxI-t tartalmazó HoxEDMhoxI törzsben a fotoszintetikus reakciócentrumot kódoló gének expressziós szintje eléri a kiindulási törzs (GB1121) értékét. A fénygyűjtő komplex  $\alpha$  és  $\beta$  alegységeit kódoló gének a fotoszintetikus reakcióközpont génjeihez hasonló expressziós mintázatot mutatnak az általunk vizsgált három törzs esetében: a HoxEDM\_DSK törzsben 50 %-os a gének kifejeződési szintje a GB1121 törzshöz képest, míg a HoxEDMhoxI törzs közel 100 %-os értékeket mutat a GB1121 törzshöz hasonlítva (18. ábra).

Mindössze két olyan gént találtunk, amelyek expressziós szintje jelentősen lecsökken a *hox1E* gén hiányában és ez az alacsony expressziós szint a heterológ *hoxI* gén bevitele esetén is megmarad. A GB1121 törzsben tapasztalt értékhez képest mindössze 40 % körüli génkifejeződést tapasztaltunk a NADH dehidrogenáz 5-ös alegységét kódoló génnel

homológ gén és egy 3' irányban közvetlenül mellette elhelyezkedő hipotetikus transzmembrán fehérjét kódoló gén esetében a *hox1E* gén hiányában. Ez az alacsony expressziós szint a *hoxI* gén bevitelével még tovább csökkent, a GB1121 törzshöz viszonyítva 20%-os génkifejeződést tapasztaltunk az említett két gén esetében. (18. ábra).



**18. ábra: *hox1E* mutációjával befolyásolt gének expressziója  
a GB1121, a HoxEDM\_DSK és a HoxEDMhoxI törzsekben**

100%-nak tekintettem minden gén esetében a GB1121 törzsben tapasztalt génexpressziót.

A teljes transzkriptom analízis eredményeinek validálása céljából a fent kiemelt gének expresszióját reverz transzkripció kapcsolt valós idejű PCR-rel ellenőriztem. Minden esetben a transzkriptom analízissel megegyező mintázatot és génexpressziós értékeket kaptam.

## VII. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

### 1. HupO regulátor szerepe a HupSL hidrogenáz működésében

A Hup-típusú membránkapcsolt NiFe hidrogenázok a molekuláris hidrogént elektron és energiaforrásként képesek hasznosítani. Számos cianobaktériumban azonosítottak HupSL hidrogenázt, amely a nitrogenáz által melléktermékként előállított molekuláris hidrogént képes visszapumpálni a sejtbe, helyreállítva ezáltal a sejt energiamérlegét (Tamagnini és mtsai., 2007). Korábbi kísérletek azt mutatták, hogy a *T. roseopersicina*-ban lévő HupSL hidrogenázt kódoló gének konstitutív, viszonylag alacsony expressziós szintet mutatnak, amely értéket a hidrogén jelenléte nem befolyásolja. A hidrogéntől független HupSL aktivitás meglepő jelenség, mivel a *T. roseopersicina* genomjában megtalálhatóak a hidrogénérzékelő enzimet kódoló szekvenciák, azonban a *hupTUV* gének ebben az organizmusban inaktívak, nem képződik róluk fehérje (Kovács és mtsai., 2005). A hidrogénnel szemben a tioszulfát, mint elsődleges elektron donor erősen befolyásolja a *hupSL* expressziót. GB1131 ( $\Delta hynSL$ ,  $\Delta hox1H$ ) törzsben kizárólag alacsony tioszulfát koncentráció mellett aktív a HupSL hidrogenáz, amikor energiaszükségleteit  $H_2$  felvételével fedezi a sejt (Palágyi-Mészáros és mtsai., 2009).

A *hup* operonban azonosítottunk egy ismeretlen funkciójú, rövid ORF-et kódoló szekvenciát a *hupI* és *hupR* gének között, amelyet *hupO*-nak neveztünk el. További *hupO*-val homológ *orf*-ek találhatók a *T. roseopersicina* genomjában, melyek mind szabályozó fehérjékkel mutatnak kisebb-nagyobb rokonságot. In frame deléciós mutagenézissel előállított HOD1 ( $\Delta hynSL$ ,  $\Delta hupO$ ) és HOD13 ( $\Delta hynSL$ ,  $\Delta hox1H$ ,  $\Delta hupO$ ) törzsek segítségével vizsgáltam a *hupO* gén sejtben betöltött szerepét. A HupSL hidrogén visszavevő aktivitása jelentősen megnőtt a HOD13 törzsben a GB1131 törzsben mért értékekhez képest alacsony tioszulfát koncentráció alkalmazásakor. Ahogyan korábban a GB1131 törzs esetében a tioszulfát koncentrációval fordítottan arányos hidrogenáz aktivitást figyeltek meg (Palágyi-Mészáros és mtsai., 2009), az általunk vizsgált HOD13 törzs szintén magasabb hidrogén visszavevő aktivitást mutatott a tápoldat tioszulfát koncentrációjának csökkentésével. A *hupO* gén hiányának pozitív hatása a HupSL aktivitásra azonban csak alacsony tioszulfát koncentráció esetén volt megfigyelhető. A tápoldat magas tioszulfát tartalma esetében (4 g/l) a GB1131 és a HOD13 törzsek hidrogén felvétele egyaránt minimális, csaknem nulla. Ezen körülmények között a *hupO*-mediált HupSL repressziót elfedi a magas tioszulfát koncentráció. Hasonló különbség figyelhető meg a törzsek *in vitro*

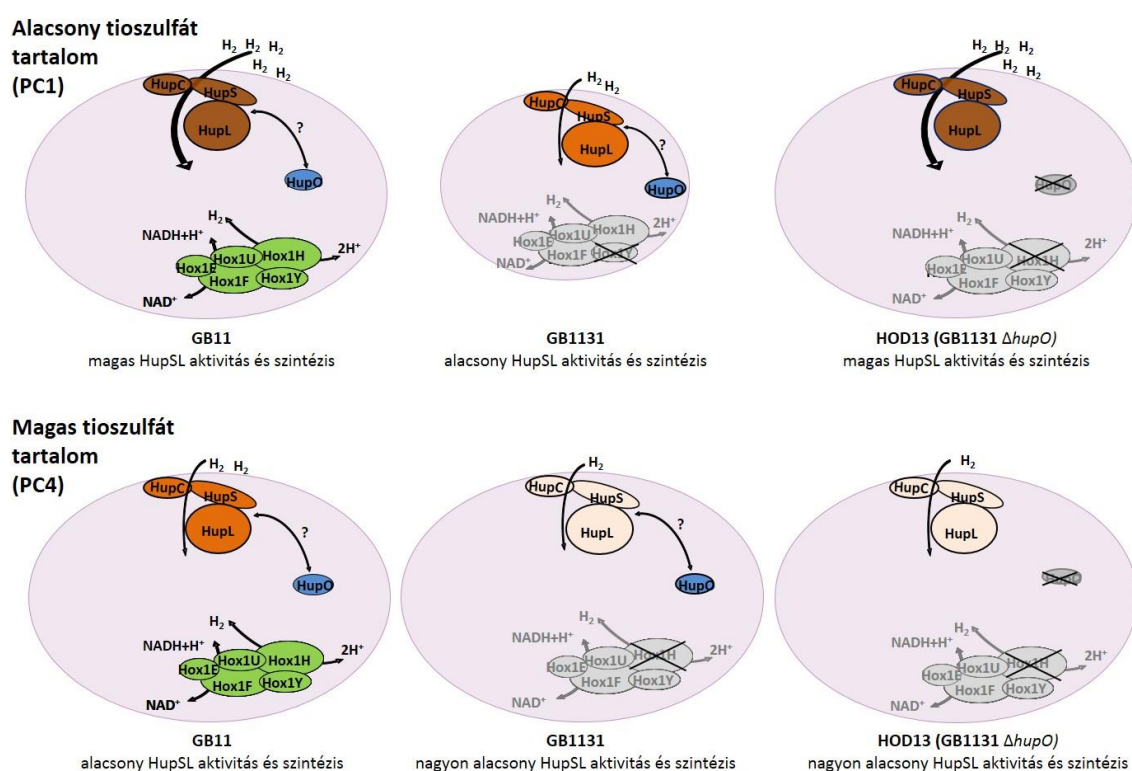
hidrogenáz aktivitásában. A HOD13 törzsben a HupSL RNS és fehérje szintje egyaránt jóval magasabb volt alacsony tioszulfát koncentráció mellett, mint a GB1131 törzsben. A tény, hogy a BBS (vad típus) és a GB11 (*hynSL* mutáns) törzsekkel megegyező HupL fehérje szintet produkált a HOD13 (*hynSL*, *hox1H* és *hupO*) arra enged következtetni, hogy a baktériumban található hidrogenáz enzimek kapcsolatban vannak egymással, a Hox1 hidrogenáz hiánya hatással van a HupSL működésére. A Hox1 hidrogenáz hiányában valóban jelentősen lecsökken a HupSL hidrogén visszavevő aktivitása, amelyet a *hupO* deléciónja képes helyreállítani és a vad típusban megfigyelt, magas HupSL aktivitás áll vissza a HOD13 törzsben. A HupO fehérje egy egyelőre ismeretlen mechanizmussal koordinálja a HupSL és Hox1 hidrogenázok működését, a HupO valószínűleg egy olyan represszor fehérje, amely kizárólag a Hox1 hiányában aktív. A *hupO* RNS és HupO fehérje szintjében nem figyelhető meg olyan változás, ami azt mutatná, hogy poszttranszlációs szabályozásról van szó. Korábbi eredmények bizonyították, hogy a Hox1 hidrogenáz kétirányú elektronpumpaként nélkülözhetetlen szerepet tölt be a *T. roseopersicina* redox homeosztázisában (Rákhely és mtsai., 2007). A Hox1 tehát központi helyet foglal el a baktérium NiFe hidrogenázai között, és direkt vagy indirekt módon hatással van az összes többi hidrogenáz enzim működésére. A HupO feltételezhetően egy molekuláris kapcsolóként működik a Hox1 és a HupSL között, a központi szerepű Hox1 hiányában ez a kapcsoló gátló pozícióban áll és alacsony szinten tartja a HupSL szintézist és hidrogén felvevő aktivitást.

A GB1131 törzsszel szemben alacsony tioszulfát koncentráció mellett jelentős hidrogénfüggés figyelhető meg a HOD13 törzs *hupL* transzkripciós szintjében, illetve a HupL fehérje szintézisében egyaránt. A HupSL hidrogenáz aktivitása független a hidrogén jelenlététől, ha a sejt tartalmazza a Hox1 hidrogenázt, illetve a Hox1 hidrogenáz hiányában is, amíg a HupO jelen van.

Eredményeimet összegezve kijelenthetem, hogy a *T. roseopersicina* HupSL hidrogenáza háromlépcsős szabályozás alatt áll. Az általunk felállított modellben a tioszulfát az elsődleges regulátor, amikor a környezetben magas a tioszulfát koncentráció, nincs szüksége a sejtnak a molekuláris hidrogénből nyerhető energiára, ezért a HupSL hidrogenáz aktivitása gátolt minden törzsben, függetlenül a *hupO*, illetve másik hidrogenáz enzimek jelenlététől vagy hiányától. Alacsony tioszulfát koncentrációt alkalmazva a törzsek HupSL aktivitása megnő, kivéve a Hox1 mutáns törzs esetében. A HupSL aktivitás és a HupL fehérje mennyisége is jóval alacsonyabb GB1131-ben, mint a Hox1-et tartalmazó törzsekben (BBS,



GB11), ami arra utal, hogy kapcsolat van a HupSL és a Hox1 hidrogenázok működése között. Mivel a GB1131 alacsony Hup aktivitása és expressziója jelentősen megnő a *hupO* mutáció hatására, kijelenthetjük, hogy a HupO represszorként a HupSL hidrogenáz másodlagos szabályzója. A HupSL működését befolyásoló harmadik tényező a hidrogén. A Hox1 hidrogenáz hiányában előidézett *hupO* mutáció hatására a sejt *hupSL* expressziója hidrogénfüggővé válik, a szintetizált HupL fehérje mennyiségét befolyásolja az, hogy a környezetben található hidrogén vagy sem. Az általunk felállított többszintű szabályozás elemeit a 19. ábra foglalja össze.



**19. ábra: HupSL működését befolyásoló tényezők összefoglalása**

A sejtek mérete korrelál a törzsek növekedési sebességével, a H<sub>2</sub> molekulák száma a hidrogénfelvétel mértékével. A színek erőssége megfelel az adott fehérje mennyiségének (sötétebb szín magasabb fehérje szintézist jelent). A szürke fehérjék inaktívak (illetve hiányoznak) az adott törzsben.

Vizsgálataink során azonban néhány kérdésre nem kaptunk választ. Miért tartja a HupO folyamatos gátlás alatt a *hupSL* gének expresszióját és a HupSL hidrogén felvevő aktivitását alacsony tioszulfát koncentráció mellett, amikor a HupSL általi hidrogénfelvétel lenne az egyik leghatékonyabb energianyerő folyamat a sejt számára? Ennek az lehet a magyarázata,

hogy egy finomhangolású kommunikációs hálózat van a *T. roseopersicina* hidrogenázai között és a természetben az általunk létrehozott mutáns kombinációk nem fordulnak elő.

A *hupO* mellett több hasonló gént is azonosítottunk a *T. roseopersicina* genomban. Ezen *hupO*-szerű génekről nincs információnk, azt azonban tudjuk, hogy a *hupO*-szerű géneket tartalmazó operonok által kódolt enzimek a hidrogenázokhoz hasonlóan a sejtek redox homeosztázisának fenntartásában játszanak szerepet. Valószínűleg a *hupO*-szerű gének is valós fehérjéket kódolnak, és ezek a fehérjék is a HupO-hoz hasonló szabályozó funkciót töltenek be ebben a fototróf baktériumban. Érdekes módon más organizmusokban sehol nem találtunk hasonló géneket, mely azt valószínűsíti, hogy egy *Thiocapsa*-specifikus szabályozó rendszer elemeit azonosítottuk.

## 2. A HoxI heterológ fehérje hatása a Hox1 hidrogenázra

A *T. roseopersicina* Hox1 és a *R. eutropha* szolubilis hidrogenáza két hasonló felépítésű enzim. A két hidrogenáz (HoxYH) és két diaforáz (HoxFU) alegységek mellett a *T. roseopersicina* esetében egy monomer (Hox1E), míg a *R. eutropha*-ban egy dimer formában jelenlévő (HoxI<sub>2</sub>) fehérje játszik szerepet az elektrontranszportban. A sejtben betöltött hasonló funkciójuk alapján elképzelhető volt, hogy a két fehérje helyettesíteni tudja egymás funkcióját, vagy legalábbis befolyásolni képesek a heterológ gazda hidrogenáz enzimének működését. A *hoxI* gén bejuttatásával a Hox1 hidrogenázt tartalmazó *T. roseopersicina* törzsbe (GB112141) jelentősen megnőtt a Hox1 *in vivo* hidrogéntermelő aktivitása magas tioszulfát koncentráció alkalmazásakor. A sejtnövekedés korai fázisában még nem figyelhető meg a HoxI pozitív hatása, az ötödik naptól kezdve azonban egyre nagyobb mértékben növeli a Hox1 általi hidrogéntermelést a HoxI fehérje jelenléte. Elképzelhető, hogy a Hox1E mellett a HoxI egy extra elektrontranszport fehérjeként szerepel a heterológ gazdában, amely képes emelni az endogén elektrontranszport hatékonyságán, például azzal, hogy a Hox1 hidrogenáz hidrogéntermelése szempontjából fontos NADH megkötését elősegíti a sejtben. Ezt az a megfigyelés is alátámaszthatja, hogy a HoxI pozitív hatása kizárólag magas tioszulfát koncentráció mellett tapasztalható (minél magasabb a tápoldat tioszulfát tartalma annál nagyobb mértékben növeli a HoxI a sejt hidrogéntermelését), azaz egy további elektron szelepet jelent a HoxI a Hox1 hidrogenáz alegységei felé. A *T. roseopersicina* elektrondonorként szerves szubsztrátokat és redukált kénvegyületeket (tioszulfátot) képes felhasználni. A HoxI gazdasejtjében a NADPH kötéséért felelős, a HoxI-mentes szolubilis hidrogenáz *R. eutropha*-ban csak a NADH hasznosítására képes csakúgy,

mint a *T. roseopersicina* NAD<sup>+</sup> redukáló Hox1 hidrogenáza. Elképzelhető, hogy a HoxI-t tartalmazó *T. roseopersicina* törzs NAD<sup>+</sup> és NADP<sup>+</sup> redukciójára egyaránt képes, ezáltal nagyobb mennyiségű felesleges elektron kijuttatására képes a sejt, azaz több hidrogént állít elő a 112141hoxI törzs, mint a 112141 Hox1 hidrogenázt tartalmazó *T. roseopersicina*.

A *hox1E* deléciós mutáns Hox1 hidrogenáz *in vivo* hidrogéntermelését a heterológ *hoxI* gén bevitele nem tudja helyreállítani. Bár a HoxI nem képes helyettesíteni a *T. roseopersicina* Hox1E fehérje *in vivo* szerepét, több olyan gén expressziós szintjét képes visszaállítani, melyek a HoxEDM (GB1121 $\Delta$ *hox1E*) törzsben jelentősen lecsökkennek a GB1121 törzs expressziós értékeihez képest. A Hox1 és Hox2 hidrogenázoknak, valamint a fotoszintetikus reakcióközpont és a fénygyűjtő komplex működéséhez egyaránt rendkívül fontos a megfelelő hatékonyságú elektrontranszport, az elektronpumpák hibátlan működése. A *hox1E* hiányában tapasztalt jóval alacsonyabb *hox2* génexpressziós értékek azt mutatják, hogy a *T. roseopersicina* hidrogenáz enzimek kapcsolatban állnak egymással, a *hox1E* hiánya a másik szolubilis hidrogenáz gének kifejeződését is lecsökkenti, így indirekt módon a Hox2 aktivitását is befolyásolja. A Hox1E hiányában feltételezhetően a fotoszintetikus elektrontranszport folyamatok működése is sérül, melyet a fotoszintetikus centrum struktúrfehérjéit kódoló gének expressziós szintjének általános csökkenése mutat. A heterológ *hoxI* gén bevitele a *hox1E* mutáns törzsbe visszaállítja a fotoszintetikus reakcióközpont és a fénygyűjtő komplex expressziós szintjeit az eredeti szintre, valószínűleg a heterológ HoxI alternatív elektronpumpaként, szelepként képes funkcionálni a *T. roseopersicina* sejtekben. A HoxI ezen helyettesítő funkciója meglepő jelenség, mivel a HoxI gazdaszervezete, a *R. eutropha* egy nem fotoszintetizáló kemolitotróf baktérium.

Teljesen más jelenség figyelhető meg a NADH dehidrogenáz 5-ös alegységével magas hasonlóságot mutató és a szomszédos hipotetikus fehérjét kódoló gének expressziója esetében. E két gén expressziós szintje is szignifikánsan csökken a *hox1E* hiányában, azonban ebben az esetben a heterológ HoxI fehérje bevitele nem állítja vissza az eredeti expressziós szinteket. Ez a NADH 5-szerű alegység magas homológiát mutat az *E. coli*-ban NouL-ként ismert proton antiporter-szerű fehérjével, amely a NADH-kinon oxidoreduktáz enzimkomplex része. A respirációs komplex 1-hez kapcsolódó NADH-kinon oxidoreduktáz (Nuo) egy több alegységű enzim, amely egy hidrofíl periplazmatikus és egy hidrofób membránkapcsolt doménból épül fel. A hidrofób domén három proton antiporter-szerű fehérjét (*E. coli*-ban NuoL, NuoM és NuoN) tartalmaz (Torres-Bacete és mtsai., 2011). *E. coli*-ban a NuoL hiányában megszűnik a Na<sup>+</sup> transzport, valamint a H<sup>+</sup> átvitel is jóval

alacsonyabb szinten zajlik. Így arra következtethetünk, hogy a NuoL alegység szállítja a  $\text{Na}^+$  és a  $\text{H}^+$  ionokat, vagy a NuoL befolyásolja más alegységek működését, amelyek az iontranszportot végzik (Marreiros és mtsai., 2014). A Hox1E érdekes szekvenciahasonlóságot mutat a *T. roseopersicina*-ban található NuoE fehérjével, amely a Nuo komplex elektron transzportért felelős alegysége (Rákhely és mtsai., 2004). Fontos azonban megjegyezni, hogy a *Thiocapsa roseopersicina* genomban is megtalálhatóak a teljes Nuo komplexet kódoló gének, azaz a már említett NADH 5-szerű fehérje nem a *Thiocapsa* NuoL fehérjéje, hanem annak csupán egy homológja. A valódi Nuo komplexet kódoló gének expressziójában nem tapasztaltunk változást a *hox1E* mutációja következtében. Az általunk vizsgált két gén által kódolt alegységeket (NADH 5-szerű és a mellette található hipotetikus transzmembrán fehérje) tehát a sejt proton transzportjában résztvevő fehérjéknek tekintjük, melyek vélhetően függetlenek a Nuo komplextől és kapcsolatban állnak a Hox1E-n keresztül a sejt hidrogén metabolizmusával, szerepet játszanak a Hox1 hidrogéntermelése általi redukáló erő feleslegtől való megszabadulásban. E két fehérje metabolikus kapcsolatainak részletesebb vizsgálata (pl. a Nuo komplexhez való viszonya) érdekes feladat, az általunk végzett deléciós mutáns analízis nem vezetett eredményre, ugyanis a géneket nem tudtuk kiütni, vélhetően esszenciális fehérjéket kódolnak. Számos *Chromatiaceae* családba tartozó baktériumban megtalálható ennek a két génnek a homológja, ahol szintén egymás mellett helyezkednek el a genomban. További érdekesség, hogy kizárólag olyan organizmusokban azonosítottuk e két gén homológjait (minden esetben egymás mellett), amelyek aktív kénmetabolizmust tartanak fenn. A NADH dehidrogenáz 5 homológ alegység esetében az azonosság mértéke *Thiocapsa marina*-ban 93%, *Marichromatium purpuratum*-ban 75%, *Thioflavicoccus mobilis*-ben 61%, míg a *Thiomonas intermedia*  $\beta$ -proteobaktérium esetében 56% a *T. roseopersicina* NADH 5-ös génhez viszonyítva. Ezek az információk arra utalnak, hogy a két fehérje valamilyen módon a sejtek kénmetabolizmusát kapcsolja össze a *hox1E*-n keresztül a hidrogéntermeléssel. A heterológ HoxI tehát a *hox1E* kén- és hidrogén-metabolizmust összekapcsoló funkcióját nem tudja komplementálni, amely egyáltalán nem meglepő az eredeti gazdaszervezet fiziológiájának ismeretében, hiszen a *R. eutropha* a *T. roseopersicina*-ban központi jelentőségű kénmetabolizmussal nem rendelkezik. Összességében elmondható, hogy *T. roseopersicina*-ban szorosan összefügg három alapvető anyagcsere-folyamat, a fotoszintézis, a sejtek kénmetabolizmusa és a hidrogénmetabolizmus, és az egyik összekötő kulcsfehérje a *hox1E*.

## VIII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, Dr. Maróti Gergelynek és Dr. Rákhely Gábornak, akiknek útmutatásával elsajátítottam a kutatómunka alapjait, a molekuláris biológiai technikákat és ismereteket. Hálás vagyok irántam tanúsított végtelen bizalmukért és türelmükért, hogy támogatták kutatómunkámat, dolgozatom elkészültét. Köszönettel tartozom tanácsaikért, melyekkel mindig készségesen segítettek a felmerülő kérdések és problémák megoldásában.

Köszönettel tartozom Prof. Kovács Kornélnak, az SzTE Biotechnológiai Tanszék korábbi vezetőjének, akinek a jóvoltából a Biotechnológiai Tanszék szakdolgozója, majd Ph.D. hallgatója lehettem. Köszönöm értékes szakmai tanácsait, bátorítását és támogatását.

Hálás vagyok Prof. Kondorosi Évának, aki helyet és lehetőséget biztosított a BZAKA BayGen Intézetben, majd az MTA SzBK Biokémiai Intézet Szimbiózis és Funkcionális Genomikai Egységében a dolgozatomhoz szükséges kísérletek elvégzéséhez.

Köszönöm a Biokémiai Intézet és a Biotechnológiai Tanszék minden dolgozójának a munkámhoz nyújtott segítséget.

A dolgozatban bemutatott munka elkészüléséhez támogatást nyújtott a TÁMOP-4.2.4.A/2-11/1-2012-0001 jelű Nemzeti Kiválóság Program keretein belül elnyert Apáczai Csere János Doktoranduszi Ösztöndíj pályázat.

## IX. IRODALOMJEGYZÉK

1. Adams M. W. W. (1990). The Structure and Mechanism of Iron-Hydrogenases. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1020(2)**: 115-145.
2. Adams M. W. W., Mortenson L. E. és Chen J. S. (1980). Hydrogenase. *Biochimica Et Biophysica Acta* **594(2-3)**: 105-176.
3. Afting C., Hochheimer A. és Thauer R. K. (1998). Function of H<sub>2</sub>-forming methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase from *Methanobacterium thermoautotrophicum* in coenzyme F<sub>420</sub> reduction with H<sub>2</sub>. *Archives of Microbiology* **169(3)**: 206-210.
4. Baginsky C., Palacios J. M., Imperial J., Ruiz-Argueso T. és Brito B. (2004). Molecular and functional characterization of the *Azorhizobium caulinodans* ORS571 hydrogenase gene cluster. *FEMS Microbiology Letters* **237(2)**: 399-405.
5. Bartha R. (1962). Physiological studies on the chemolithotropic metabolism of recently isolated *Hydrogenomonas* strains. *Archiv für Mikrobiologie* **41**: 313-350.
6. Bartha R. és Ordal E. J. (1965). Nickel-Dependent Chemolithotrophic Growth of Two *Hydrogenomonas* Strains. *Journal of Bacteriology* **89**: 1015-1019.
7. Bernhard M., Schwartz E., Rietdorf J. és Friedrich B. (1996). The *Alcaligenes eutrophus* membrane-bound hydrogenase gene locus encodes functions involved in maturation and electron transport coupling. *Journal of Bacteriology* **178(15)**: 4522-4529.
8. Bertani G. (1951). A Method for Detection of Mutations, Using Streptomycin Dependence in *Escherichia Coli*. *Genetics* **36(6)**: 598-611.
9. Black L. K., Fu C. L. és Maier R. J. (1994). Sequences and Characterization of *hupU* and *hupV* Genes of *Bradyrhizobium japonicum* Encoding a Possible Nickel-Sensing Complex Involved in Hydrogenase Expression. *Journal of Bacteriology* **176(22)**: 7102-7106.

10. Blokesch M. és Böck A. (2002). Maturation of [NiFe]-hydrogenases in *Escherichia coli*: the HypC cycle. *Journal of Molecular Biology* **324(2)**: 287-296.
11. Blokesch M., Albracht S. P., Matzanke B. F., Drapal N. M., Jacobi A. és Böck A. (2004). The complex between hydrogenase-maturation proteins HypC and HypD is an intermediate in the supply of cyanide to the active site iron of [NiFe]-hydrogenases. *Journal of Molecular Biology* **344(1)**: 155-167.
12. Bogorov L. V. (1974). About the properties of *Thiocapsa roseopersicina*, strain BBS, isolated from estuaria of White Sea. *Mikrobiologija* (**43**): 326-332.
13. Boison G., Schmitz O., Schmitz B. és Bothe H. (1998). Unusual gene arrangement of the bidirectional hydrogenase and functional analysis of its diaphorase subunit HoxU in respiration of the unicellular cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Current Microbiology* **36(5)**: 253-258.
14. Böhm R., Sauter M. és Böck A. (1990). Nucleotide-Sequence and Expression of an Operon in *Escherichia-Coli* Coding for Formate Hydrogenylase Components. *Molecular Microbiology* **4(2)**: 231-243.
15. Braun K. A., Parua P. K., Dombek K. M., Miner G. E. és Young E. T. (2013). 14-3-3 (Bmh) proteins regulate combinatorial transcription following RNA polymerase II recruitment by binding at Adr1-dependent promoters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* **33(4)**: 712-724.
16. Brito B., Martinez M., Fernandez D., Rey L., Cabrera E., Palacios J. M., Imperial J. és Ruiz-Argueso T. (1997). Hydrogenase genes from *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* are controlled by the nitrogen fixation regulatory protein nifA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94(12)**: 6019-6024.
17. Bui E. T. N. és Johnson P. J. (1996). Identification and characterization of [Fe]-hydrogenases in the hydrogenosome of *Trichomonas vaginalis*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **76(1-2)**: 305-310.

18. Burgdorf T., van der Linden E., Bernhard M., Yin Q. Y., Back J. W., Hartog A. F., Muijsers A. O., de Koster C. G., Albracht S. P. J. és Friedrich B. (2005). The soluble NAD(+)-reducing [NiFe]-Hydrogenase from *Ralstonia eutropha* H16 consists of six subunits and can be specifically activated by NADPH. *Journal of Bacteriology* **187(9)**: 3122-3132.
19. Burgess B. K. és Lowe D. J. (1996). Mechanism of molybdenum nitrogenase. *Chemical Reviews* **96(7)**: 2983-3011.
20. Calderon C. E., Carrion V. J., de Vicente A. és Cazorla F. M. (2014). *darR* and *darS* are regulatory genes that modulate 2-hexyl, 5-propyl resorcinol transcription in *Pseudomonas chlororaphis* PCL1606. *Microbiology* **160(Pt 12)**: 2670-2680.
21. Cammack R., M. Frey and R. Robson (2001). Hydrogen as a fuel Learning from Nature *Taylor & Francis*
22. Casalot L. és Rousset M. (2001). Maturation of the [NiFe] hydrogenases. *Trends in Microbiology* **9(5)**: 228-237.
23. Colbeau A. és Vignais P. M. (1992). Use of *hupS::lacZ* gene fusion to study regulation of hydrogenase expression in *Rhodobacter capsulatus*: stimulation by H<sub>2</sub>. *Journal of Bacteriology* **174(13)**: 4258-4264.
24. Colbeau A., Kovács K. L., Chabert J. és Vignais P. M. (1994). Cloning and Sequences of the Structural (*Hupslc*) and Accessory (*Hupdhi*) Genes for Hydrogenase Biosynthesis in *Thiocapsa-Roseopersicina*. *Gene* **140(1)**: 25-31.
25. Dementin S., Burlat B., De Lacey A. L., Pardo A., Adryanczyk-Perrier G., Guigliarelli B., Fernandez V. M. és Rousset M. (2004). A glutamate is the essential proton transfer gate during the catalytic cycle of the [NiFe] hydrogenase. *Journal of Biological Chemistry* **279(11)**: 10508-10513.
26. Deppenmeier U. (1995). Different structure and expression of the operons encoding the membrane-bound hydrogenases from *Methanosarcina mazei* Go1. *Archives of Microbiology* **164(5)**: 370-376.



27. Dervede J., Eitinger T., Patenge N. és Friedrich B. (1996). *hyp* gene products in *Alcaligenes eutrophus* are part of a hydrogenase-maturation system. *European Journal of Biochemistry* **235(1-2)**: 351-358.
28. Dischert V., Vignais P. M. és Colbeau A. (1999). The synthesis of *Rhodobacter capsulatus* HupSL hydrogenase is regulated by the two-component HupT/HupR system. *Molecular Microbiology* **34(5)**: 995-1006.
29. Elsen S., Richaud P., Colbeau A. és Vignais P. M. (1993). Sequence analysis and interposon mutagenesis of the *hupT* gene, which encodes a sensor protein involved in repression of hydrogenase synthesis in *Rhodobacter capsulatus*. *Journal of Bacteriology* **175(22)**: 7404-7412.
30. Elsen S., Colbeau A., Chabert J. és Vignais P. M. (1996). The *hupTUV* operon is involved in negative control of hydrogenase synthesis in *Rhodobacter capsulatus*. *Journal of Bacteriology* **178(17)**: 5174-5181.
31. Elsen S., Dischert W., Colbeau A. és Bauer C. E. (2000). Expression of uptake hydrogenase and molybdenum nitrogenase in *Rhodobacter capsulatus* is coregulated by the RegB-RegA two-component regulatory system. *Journal of Bacteriology* **182(10)**: 2831-2837.
32. Ewart G. D. és Smith G. D. (1989). Purification and Properties of Soluble Hydrogenase from the Cyanobacterium *Anabaena-Cylindrica*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **268(1)**: 327-337.
33. Fodor B. D., Kovács Á. T., Csáki R., Hunyadi-Gulyás E., Klement E., Maróti G., Mészáros L. S., Medzihradszky K. F., Rákhely G. és Kovács K. L. (2004). Modular broad-host-range expression vectors for single-protein and protein complex purification. *Applied and Environmental Microbiology* **70(2)**: 712-721.
34. Fox J. D., Kerby R. L., Roberts G. P. és Ludden P. W. (1996). Characterization of the CO-induced, CO-tolerant hydrogenase from *Rhodospirillum rubrum* and the gene encoding the large subunit of the enzyme. *Journal of Bacteriology* **178(6)**: 1515-1524.

35. Friedrich B. és Schwartz E. (1993). Molecular-Biology of Hydrogen Utilization in Aerobic Chemolithotrophs. *Annual Review of Microbiology* **47**: 351-383.
36. Friedrich B., Heine E., Finck A. és Friedrich C. G. (1981). Nickel Requirement for Active Hydrogenase Formation in *Alcaligenes-Eutrophus*. *Journal of Bacteriology* **145(3)**: 1144-1149.
37. Fu C., Olson J. W. és Maier R. J. (1995). HypB protein of *Bradyrhizobium japonicum* is a metal-binding GTPase capable of binding 18 divalent nickel ions per dimer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92(6)**: 2333-2337.
38. Graf E. G. és Thauer R. K. (1981). Hydrogenase from *Methanobacterium-Thermoautotrophicum*, a Nickel-Containing Enzyme. *FEBS Letters* **136(1)**: 165-169.
39. Grzeszik C., Lubbers M., Reh M. és Schlegel H. G. (1997). Genes encoding the NAD-reducing hydrogenase of *Rhodococcus opacus* MR11. *Microbiology* **143 (4)**: 1271-86.
40. Hanczár T., Csáki R., Bodrossy L., Murrell J. C. és Kovács K. L. (2002). Detection and localization of two hydrogenases in *Methylococcus capsulatus* (Bath) and their potential role in methane metabolism. *Archives of Microbiology* **177(2)**: 167-172.
41. Happe R. P., Roseboom W., Pierik A. J., Albracht S. P. J. és Bagley K. A. (1997). Biological activation of hydrogen. *Nature* **385(6612)**: 126-126.
42. Happe T., Schütz K. és Böhme H. (2000). Transcriptional and mutational analysis of the uptake hydrogenase of the filamentous cyanobacterium *Anabaena variabilis* ATCC 29413. *Journal of Bacteriology* **182(6)**: 1624-1631.
43. Happe T., Hemschemeier A., Winkler M. és Kaminski A. (2002). Hydrogenases in green algae: do they save the algae's life and solve our energy problems? *Trends in Plant Science* **7(6)**: 246-250.

44. Hartmann G. C., Klein A. R., Linder M. és Thauer R. K. (1996). Purification, properties and primary structure of H<sub>2</sub>-forming N-5,N(10)methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase from *Methanococcus thermolithotrophicus*. *Archives of Microbiology* **165(3)**: 187-193.
45. Herrero M., Delorenzo V. és Timmis K. N. (1990). Transposon Vectors Containing Non-Antibiotic Resistance Selection Markers for Cloning and Stable Chromosomal Insertion of Foreign Genes in Gram-Negative Bacteria. *Journal of Bacteriology* **172(11)**: 6557-6567.
46. Hoch J. A. és Silhavy T. J. (1995). Two component signal transduction. *ASM Press Washington, D. C.*
47. Howard J. B. és Rees D. C. (1996). Structural basis of biological nitrogen fixation. *Chemical Reviews* **96(7)**: 2965-2982.
48. Inoue H., Nojima H. és Okayama H. (1990). High-Efficiency Transformation of *Escherichia-Coli* with Plasmids. *Gene* **96(1)**: 23-28.
49. Karstens K., Wahlefeld S., Horch M., Grunzel M., Lauterbach L., Lenzian F., Zebger I. és Lenz O. (2015). Impact of the Iron-Sulfur Cluster Proximal to the Active Site on the Catalytic Function of an O<sub>2</sub>-Tolerant NAD(+)-Reducing [NiFe]-Hydrogenase. *Biochemistry* **54(2)**: 389-403.
50. Kim D. H. és Kim M. S. (2011). Hydrogenases for biological hydrogen production. *Bioresource Technology* **102(18)**: 8423-8431.
51. Kondratieva E. N., Zhukov V. G., Ivanovsky R. N., Petushkova Y. P. és Monosov E. Z. (1976). Capacity of Phototropic Sulfur Bacterium *Thiocapsa-Roseopersicina* for Chemosynthesis. *Archives of Microbiology* **108(3)**: 287-292.
52. Kortluke C., Hogrefe C., Eberz G., Puhler A. és Friedrich B. (1987). Genes of Lithoautotrophic Metabolism Are Clustered on the Megaplasmid Phg1 in *Alcaligenes-Eutrophus*. *Molecular & General Genetics* **210(1)**: 122-128.

53. Kortlueke C., Horstmann K., Schwartz E., Rohde M., Binsack R. és Friedrich B. (1992). A Gene-Complex Coding for the Membrane-Bound Hydrogenase of *Alcaligenes-Eutrophus-H16*. *Journal of Bacteriology* **174(19)**: 6277-6289.
54. Kovács Á. T., Rákhely G., Browning D. F., Fülöp A., Maróti G., Busby S. J. W. és Kovács K. L. (2005). An FNR-type regulator controls the anaerobic expression of hyn hydrogenase in *Thiocapsa roseopersicina*. *Journal of Bacteriology* **187(8)**: 2618-2627.
55. Kovács Á. T., Rákhely G., Balogh J., Maróti G., Cournac L., Carrier P., Mészáros L. S., Peltier G. és Kovács K. L. (2005). Hydrogen independent expression of hupSL genes in *Thiocapsa roseopersicina* BBS. *FEBS Journal* **272(18)**: 4807-4816.
56. Kovács K. L. és Bagyinka C. (1990). Structural-Properties, Functional-States and Physiological Roles of Hydrogenase in Photosynthetic Bacteria. *FEMS Microbiology Letters* **87(3-4)**: 407-411.
57. Kovács K. L., Kovács Á. T., Maróti G., Mészáros L. S., Balogh J., Latinovics D., Fülöp A., Dávid R., Dorogházi E. és Rákhely G. (2005). The hydrogenases of *Thiocapsa roseopersicina*. *Biochemical Society Transactions* **33**: 61-63.
58. Leclerc M., Colbeau A., Cauvin B. és Vignais P. M. (1988). Cloning and Sequencing of the Genes Encoding the Large and the Small Subunits of the H-2 Uptake Hydrogenase (Hup) of *Rhodobacter-Capsulatus*. *Molecular & General Genetics* **214(1)**: 97-107.
59. Lenz O. és Friedrich B. (1998). A novel multicomponent regulatory system mediates H-2 sensing in *Alcaligenes eutrophus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95(21)**: 12474-12479.
60. Lenz O., Strack A., Tran-Betcke A. és Friedrich B. (1997). A hydrogen-sensing system in transcriptional regulation of hydrogenase gene expression in *Alcaligenes* species. *Journal of Bacteriology* **179(5)**: 1655-1663.
61. Lenz O., Bernhard M., Buhrke T., Schwartz E. és Friedrich B. (2002). The hydrogen-sensing apparatus in *Ralstonia eutropha*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **4(3)**: 255-262.

62. Magalon A. és Bock A. (2000). Analysis of the HypC-hycE complex, a key intermediate in the assembly of the metal center of the Escherichia coli hydrogenase 3. *Journal of Biological Chemistry* **275(28)**: 21114-21120.
63. Maróti G., Fodor B. D., Rákhely G., Kovács Á. T., Arvani S. és Kovács K. L. (2003). Accessory proteins functioning selectively and pleiotropically in the biosynthesis of [NiFe] hydrogenases in Thiocapsa roseopersicina. *European Journal of Biochemistry* **270(10)**: 2218-2227.
64. Maróti G., Rákhely G., Maróti J., Dorogházi E., Klement E., Medzihradszky K. F. és Kovács K. L. (2010). Specificity and selectivity of HypC chaperonins and endopeptidases in the molecular assembly machinery of [NiFe] hydrogenases of Thiocapsa roseopersicina. *International Journal of Hydrogen Energy* **35(8)**: 3358-3370.
65. Maróti J., Farkas A., Nagy I. K., Maróti G., Kondorosi E., Rákhely G. és Kovács K. L. (2010). A second soluble Hox-type NiFe enzyme completes the hydrogenase set in Thiocapsa roseopersicina BBS. *Applied and Environmental Microbiology* **76(15)**: 5113-5123.
66. Marreiros B. C., Batista A. P. és Pereira M. M. (2014). Respiratory complex I from Escherichia coli does not transport Na(+) in the absence of its NuoL subunit. *FEBS Letters* **588(23)**: 4520-4525.
67. Meyer J. és Gagnon J. (1991). Primary Structure of Hydrogenase-I from Clostridium-Pasteurianum. *Biochemistry* **30(40)**: 9697-9704.
68. Nicolet Y., Piras C., Legrand P., Hatchikian C. E. és Fontecilla-Camps J. C. (1999). Desulfovibrio desulfuricans iron hydrogenase: the structure shows unusual coordination to an active site Fe binuclear center. *Structure with Folding & Design* **7(1)**: 13-23.
69. Nonaka K., Nguyen N. T., Yoon K. S. és Ogo S. (2013). Novel H<sub>2</sub>-oxidizing [NiFeSe]hydrogenase from Desulfovibrio vulgaris Miyazaki F. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **115(4)**: 366-371.

70. Oh Y. K., Raj S. M., Jung G. Y. és Park S. (2011). Current status of the metabolic engineering of microorganisms for biohydrogen production. *Bioresource Technology* **102(18)**: 8357-8367.
71. PageSharp M., Behm C. A. és Smith G. D. (1996). Tritrichomonas foetus and Trichomonas vaginalis: The pattern of inactivation of hydrogenase activity by oxygen and activities of catalase and ascorbate peroxidase. *Microbiology-Uk* **142**: 207-211.
72. Palágyi-Mészáros L. S., Maróti J., Latinovics D., Balogh T., Klement E., Medzihradszky K. F., Rákhely G. és Kovács K. L. (2009). Electron-transfer subunits of the NiFe hydrogenases in Thiocapsa roseopersicina BBS. *FEBS Journal* **276(1)**: 164-174.
73. Peters J. W. (1999). X-ray crystal structure of the Fe-only hydrogenase (Cpl) from Clostridium pasteurianum to 1.8 angstrom resolution (vol 282, pg 1853, 1998). *Science* **283(5398)**: 35-35.
74. Pfennig N. és Truper H. G. (1983). Taxonomy of phototrophic green and purple bacteria: a review. *Annales de Microbiologie (Paris)* **134B(1)**: 9-20.
75. Pierik A. J., Schmelz M., Lenz O., Friedrich B. és Albracht S. P. (1998). Characterization of the active site of a hydrogen sensor from Alcaligenes eutrophus. *FEBS Letters* **438(3)**: 231-235.
76. Pierik A. J., Roseboom W., Happe R. P., Bagley K. A. és Albracht S. P. J. (1999). Carbon monoxide and cyanide as intrinsic ligands to iron in the active site of [NiFe]-hydrogenases - NiFe(CN)<sub>2</sub>CO, biology's way to activate H<sub>2</sub>. *Journal of Biological Chemistry* **274(6)**: 3331-3337.
77. Pimentel D. (1991). Global Warming, Population-Growth, and Natural-Resources for Food-Production. *Society & Natural Resources* **4(4)**: 347-363.
78. Rákhely G., Zhou Z. H., Adams M. W. és Kovács K. L. (1999). Biochemical and molecular characterization of the [NiFe] hydrogenase from the hyperthermophilic archaeon, Thermococcus litoralis. *European Journal of Biochemistry* **266(3)**: 1158-1165.

79. Rákhely G., Laurinavichene T. V., Tsygankov A. A. és Kovács K. L. (2007). The role of Hox hydrogenase in the H-2 metabolism of *Thiocapsa roseopersicina*. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics* **1767(6)**: 671-676.
80. Rákhely G., Colbeau A., Garin J., Vignais P. M. és Kovács K. L. (1998). Unusual organization of the genes coding for HydSL, the stable [NiFe]hydrogenase in the photosynthetic bacterium *Thiocapsa roseopersicina* BBS. *Journal of Bacteriology* **180(6)**: 1460-1465.
81. Rákhely G., Kovács Á. T., Maróti G., Fodor B. D., Csanádi G., Latinovics D. és Kovács K. L. (2004). Cyanobacterial-type, heteropentameric, NAD(+)-reducing NiFe hydrogenase in the purple sulfur photosynthetic bacterium *Thiocapsa roseopersicina*. *Applied and Environmental Microbiology* **70(2)**: 722-728.
82. Reissmann S., Hochleitner E., Wang H., Paschos A., Lottspeich F., Glass R. S. és Böck A. (2003). Taming of a poison: biosynthesis of the NiFe-hydrogenase cyanide ligands. *Science* **299(5609)**: 1067-1070.
83. Richard D. J., Sawers G., Sargent F., McWalter L. és Boxer D. H. (1999). Transcriptional regulation in response to oxygen and nitrate of the operons encoding the [NiFe] hydrogenases 1 and 2 of *Escherichia coli*. *Microbiology* **145 (Pt 10)**: 2903-2912.
84. Sargent F., Berks B. C. és Palmer T. (2006). Pathfinders and trailblazers: a prokaryotic targeting system for transport of folded proteins. *FEMS Microbiology Letters* **254(2)**: 198-207.
85. Sargent F., Stanley N. R., Berks B. C. és Palmer T. (1999). Sec-independent protein translocation in *Escherichia coli*. A distinct and pivotal role for the TatB protein. *Journal of Biological Chemistry* **274(51)**: 36073-36082.
86. Sawers G. (1999). The aerobic/anaerobic interface. *Current Opinion in Microbiology* **2(2)**: 181-187.
87. Sawers R. G., Blokesch M. és Böck A. (2004). Anaerobic Formate and Hydrogen Metabolism. *EcoSal Plus* **1(1)**:

88. Sayavedrasoto L. A., Powell G. K., Evans H. J. és Morris R. O. (1988). Nucleotide-Sequence of the Genetic-Loci Encoding Subunits of Bradyrhizobium-Japonicum Uptake Hydrogenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85(22)**: 8395-8399.
89. Schäfer A., Tauch A., Jäger W., Kalinowski J., Thierbach G. és Pühler A. (1994). Small Mobilizable Multipurpose Cloning Vectors Derived from the Escherichia-Coli Plasmids Pk18 and Pk19 - Selection of Defined Deletions in the Chromosome of Corynebacterium-Glutamicum. *Gene* **145(1)**: 69-73.
90. Schlegel H. G., Kaltwasser H. és Gottschalk G. (1961). [A submersion method for culture of hydrogen-oxidizing bacteria: growth physiological studies]. *Archives of Microbiology* **38**: 209-222.
91. Schmitz O., Boison G., Hilscher R., Hundeshagen B., Zimmer W., Lottspeich F. és Bothe H. (1995). Molecular Biological Analysis of a Bidirectional Hydrogenase from Cyanobacteria. *European Journal of Biochemistry* **233(1)**: 266-276.
92. Schneider K. és Schlegel H. G. (1976). Purification and Properties of Soluble Hydrogenase from Alcaligenes-Eutrophus H 16. *Biochimica Et Biophysica Acta* **452(1)**: 66-80.
93. Serebryakova L. T., Medina M., Zorin N. A., Gogotov I. N. és Cammack R. (1996). Reversible hydrogenase of Anabaena variabilis ATCC 29413: catalytic properties and characterization of redox centres. *FEBS Letters* **383(1-2)**: 79-82.
94. Sorgenfrei O., Müller S., Pfeiffer M., Snieszko I. és Klein A. (1997). The [NiFe] hydrogenases of Methanococcus voltae: genes, enzymes and regulation. *Archives of Microbiology* **167(4)**: 189-195.
95. Szőri-Dorogházi E., Maróti G., Szőri M., Nyilasi A., Rákhely G. és Kovács K. L. (2012). Analyses of the Large Subunit Histidine-Rich Motif Expose an Alternative Proton Transfer Pathway in [NiFe] Hydrogenases. *Plos One* **7(4)**: e34666.
96. Tamagnini P., Axelsson R., Lindberg P., Oxelfelt F., Wunschiers R. és Lindblad P. (2002). Hydrogenases and hydrogen metabolism of cyanobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **66(1)**: 1-20.



97. Tamagnini P., Leitaó E., Oliveira P., Ferreira D., Pinto F., Harris D. J., Heidorn T. és Lindblad P. (2007). Cyanobacterial hydrogenases: diversity, regulation and applications. *FEMS Microbiology Reviews* **31(6)**: 692-720.
98. Tengölics R. (2014). A hidrogenázok és a kénanyagcsere kapcsolatának jellemzése fototróf bíbor kénbaktériumokban. *Doktori Disszertáció*
99. Tengölics R., Mészáros L., Győri E., Doffkay Z., Kovács K. L. és Rákhely G. (2014). Connection between the membrane electron transport system and Hyn hydrogenase in the purple sulfur bacterium, *Thiocapsa roseopersicina* BBS. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1837(10)**: 1691-1698.
100. Theodoratou E., Huber R. és Böck A. (2005). [NiFe]-Hydrogenase maturation endopeptidase: structure and function. *Biochemical Society Transactions* **33(Pt 1)**: 108-111.
101. Torres-Bacete J., Sinha P. K., Matsuno-Yagi A. és Yagi T. (2011). Structural contribution of C-terminal segments of NuoL (ND5) and NuoM (ND4) subunits of complex I from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **286(39)**: 34007-34014.
102. Toussaint B., de Sury d'Aspremont R., Delic-Attree I., Berchet V., Elsen S., Colbeau A., Dischert W., Lazzaroni Y. és Vignais P. M. (1997). The *Rhodobacter capsulatus* hupSLC promoter: identification of cis-regulatory elements and of trans-activating factors involved in H<sub>2</sub> activation of hupSLC transcription. *Molecular Microbiology* **26(5)**: 927-937.
103. Van Soom C., Lerouge I., Vanderleyden J., Ruiz-Argueso T. és Palacios J. M. (1999). Identification and characterization of hupT, a gene involved in negative regulation of hydrogen oxidation in *Bradyrhizobium japonicum*. *Journal of Bacteriology* **181(16)**: 5085-5089.
104. Vignais P. M. és Billoud B. (2007). Occurrence, classification, and biological function of hydrogenases: An overview. *Chemical Reviews* **107(10)**: 4206-4272.
105. Vignais P. M., Billoud B. és Meyer J. (2001). Classification and phylogeny of hydrogenases. *FEMS Microbiology Reviews* **25(4)**: 455-501.

106. Visscher P. T., Nijburg J. W. és Vangemerden H. (1990). Polysulfide Utilization by Thiocapsa-Roseopersicina. *Archives of Microbiology* **155(1)**: 75-81.
107. Volbeda A., Montet Y., Vernede X., Hatchikian E. C. és Fontecilla-Camps J. C. (2002). High-resolution crystallographic analysis of Desulfovibrio fructosovorans [NiFe] hydrogenase. *International Journal of Hydrogen Energy* **27(11-12)**: 1449-1461.
108. Voordouw G. és Brenner S. (1985). Nucleotide-Sequence of the Gene Encoding the Hydrogenase from Desulfovibrio-Vulgaris (Hildenborough). *European Journal of Biochemistry* **148(3)**: 515-520.
109. Young J. P. W. (1992). Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In Biological Nitrogen Fixation. *Chapman and Hall*
110. Zirngibl C., Vandongen W., Schworer B., Vonbunau R., Richter M., Klein A. és Thauer R. K. (1992). H<sub>2</sub>-Forming Methylenetetrahydromethanopterin Dehydrogenase, a Novel Type of Hydrogenase without Iron-Sulfur Clusters in Methanogenic Archaea. *European Journal of Biochemistry* **208(2)**: 511-520.

## X. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

### Dolgozat alapjául szolgáló közlemény:

Nagy Ildikó Katalin, Kovács L. Kornél, Rákhely Gábor és Maróti Gergely (2016). HupO is a novel regulator involved in thiosulfate-responsive control of HupSL NiFe-hydrogenase synthesis in *Thiocapsa roseopersicina*. *Applied and Environmental Microbiology* **82**:2039-2049. IF: 3,67

### Egyéb közlemények:

Maróti Judit, Farkas Attila, Nagy Ildikó Katalin, Maróti Gergely, Kondorosi Éva, Rákhely Gábor és Kovács L. Kornél (2010). A Second soluble NiFe enzyme completes the hydrogenase set in *Thiocapsa roseopersicina*. *Applied and Environmental Microbiology* **76**:5113-5123. IF: 3,80

Pap Bernadett, Györkei Ádám, Iulian Z Boboescu, Nagy Ildikó Katalin, Bíró Tibor, Kondorosi Éva és Gergely Maróti (2014). Temperature-dependent transformation of biogas-producing microbial communities points to the increased importance of hydrogenotrophic methanogenesis under thermophilic operation. *Bioresource Technology* **177**:375-380. IF: 5,09

### Előadások:

Nagy Ildikó Katalin, Maróti Gergely, Farkas Attila, Maróti Judit, Rákhely Gábor és Kovács L. Kornél (2010). Expression and activity analysis of Hox2 hydrogenase in *Thiocapsa roseopersicina*. Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlés, Keszthely

Nagy Ildikó Katalin, Rákhely Gábor, Kondorosi Éva, Kovács L. Kornél és Maróti Gergely (2012). Heterologous expression and analysis of HoxI function in *Thiocapsa roseopersicina*. Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlés, Keszthely

Nagy Ildikó Katalin, Rákhely Gábor, Kondorosi Éva, Kovács L. Kornél és Maróti Gergely (2014). Investigation of the metabolic context of the soluble hydrogenases in *Thiocapsa roseopersicina*. Tavaszi Szél Konferencia, Debrecen

Nagy Ildikó Katalin (2014). Investigation of the relationship of hydrogenase enzymes and photosynthesis in *Thiocapsa roseopersicina*. Szegedi Biológus Doktorandusz Konferencia, Szeged

Nagy Ildikó Katalin, Rákhely Gábor, Kondorosi Éva, Kovács L. Kornél és Maróti Gergely (2014). Investigation of the metabolic context of the soluble hydrogenases in *Thiocapsa roseopersicina*. Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlés, Keszthely

#### **Posztterek:**

Nagy Ildikó Katalin, Maróti Gergely, Farkas Attila, Maróti Judit, Rákhely Gábor és Kovács L. Kornél (2010). Identification and functional characterization of the soluble Hox2 NiFe hydrogenase in *Thiocapsa roseopersicina*. The 9<sup>th</sup> International Hydrogenase Conference, Uppsala, Sweden

Nagy Ildikó Katalin, Rákhely Gábor Kovács L. Kornél és Maróti Gergely (2015). HupO is a novel factor in the regulation of the HupSL hydrogenase in *Thiocapsa roseopersicina*. The 6th Congress of European Microbiologists FEMS, Maastricht, The Netherlands

**Összesített impakt faktor:** 12,56

**MTMT azonosító:** 10046310

## XI. ÖSSZEFOGLALÁS

A *Thiocapsa roseopersicina*  $\gamma$  proteobaktérium hidrogén anyagcseréjében résztvevő nitrogénáz és a négy funkcionális hidrogenáz részletesen tanulmányozott, jól ismert enzimek. Sokat tudunk ezen fehérjék bioszintéziséről, kifejeződésük szabályozásáról, az egyes enzimek sejten belüli szerepéről, valamint egyéb sejten belüli metabolikus útvonalakhoz való viszonyáról.

Dolgozatom egyik fő témája a *hupSL* operonban elhelyezkedő, *hupO*-ként azonosított gén által kódolt fehérje funkciójának vizsgálata, a HupO fehérje *T. roseopersicina* sejtben betöltött szerepére irányuló kísérleteim eredményeiről számolok be a disszertációban. A HupSL hidrogén felvevő hidrogenáz elsősorban a nitrogénáz által termelt hidrogén sejtbe történő visszapumpálásáért felelős enzim.

Munkámat irányított mutagenézissel kezdtem, eltávolítottam a *hupO*-t többszörös hidrogenáz mutáns *T. roseopersicina* törzsek genomjából, így szelektíven tudtam vizsgálni a HupSL hidrogenáz működését, a HupO fehérje funkcióját. A gén plazmidon történő visszavitelével helyreállítottam az eredeti fenotípust, ezáltal igazoltam, hogy a mutánsban tapasztalt változások specifikusan a *hupO* hiányának köszönhetőek. A HupSL hidrogén felvevő aktivitását vizsgálva *in vivo* és *in vitro* egyaránt azt tapasztaltam, hogy alacsony tioszulfát koncentráció mellett a HupO hiányában jelentősen megnő az enzim aktivitása GB1131 törzsben (Hyn és Hox1 mutáns törzs). Alacsony tioszulfát koncentráció alkalmazásával a sejt elektronhiányos állapota modellezhető. HupO hiányában a HupSL hidrogenáz megnövekedett aktivitásának köszönhetően a sejt lényegesen több energiához jut, feltehetőleg ennek köszönhető, hogy csaknem a vad típussal megegyező növekedési sebességet mutat a  $\Delta hupO$  törzs. Az aktivitás mérések eredményeivel összhangban a hidrogenáz nagy alegységet kódoló a *hupL* mRNS, illetve a HupL fehérje szintje egyaránt szignifikánsan megemelkedett HupO-t nem tartalmazó törzsben. *hupO* hiányában alacsony és magas tioszulfát koncentrációjú közegben egyaránt megnövekedett a törzsben a *hupL* kifejeződésének mértéke, a tapasztalt, nagyságrendekkel magasabb expressziós értékek majdnem elérték a vad típusú *T. roseopersicina*-ban mért értékeket.

A *hupO* gén hiányában bekövetkezett aktivitás és expressziós változások azonban csak abban az esetben voltak megfigyelhetőek, amikor a HynSL mellett a Hox1 szolubilis

hidrogenázt sem tartalmazta a törzs. Abban az esetben ugyanis, amikor a HupSL mellett aktív Hox1 enzim található a *hupO* hiánya sem a *hupSL* génexpressziót, sem a HupL fehérje termelődését nem befolyásolta. Ez a megfigyelés is azt bizonyítja, hogy kapcsolat van a *T. roseopersicina*-ban található hidrogenázok között, egyes hidrogenázok hiánya más hidrogenáz enzimek működését is befolyásolja. A Hox1 kétirányú hidrogenáz a baktérium hidrogén metabolizmusának kulcsenzime, ezért mutációja hatással van többek között a HupSL aktivitására is. A HupO egy olyan feltételezhetően gátló fehérje, amely csak Hox1 hiányában kapcsol be, ezzel alacsonyan tartva a HupSL hidrogén visszavevő aktivitását.

Ezidáig a *T. roseopersicina* HupSL hidrogenázának működését hidrogén függetlennek tekintették, mivel a más mikroorganizmusokban azonosított aktív HupUV hidrogénérzékelő rendszer ebben a baktériumban nem fejeződik ki, a *hupUV* gének megtalálhatóak a *T. roseopersicina* genomban, azonban csendes állapotban vannak, róluk mRNS nem képződik a vizsgált körülmények között. Az általam elkészített *hupO* mutáns törzs esetében – amikor a *hox1H* deléció következtében a Hox1 nem aktív – jelentős hidrogénfüggést figyeltem meg a gének expressziójában és a fehérjék szintézisében egyaránt. Hidrogént tartalmazó közegben történő növesztéskor a  $\Delta hupO$  törzs több mint két nagyságrenddel magasabb *hupL* génexpressziós értéket mutatott alacsony tioszulfát koncentráció mellett, mint ugyanez a törzs hidrogén-mentes közegben.

A HupO funkció meghatározásával kapcsolatos eredményeim alapján elmondható, hogy a *T. roseopersicina* HupSL hidrogenáza háromlépcsős szabályozás alatt áll. A tioszulfát mint elsődleges regulátor mellett fontos szerepe van a HupO fehérjének is, amely represszorként szabályozza a HupSL aktivitását Hox1 hidrogenáz hiányában. A  $\Delta hynSL$ ,  $\Delta hox1H$  törzsben előidézett *hupO* mutáció hatására a sejt *hupSL* expressziója hidrogén-függővé válik, a szintetizált HupL fehérje mennyiségét jelentősen befolyásolja, hogy a környezetben található az enzim számára hasznosítható hidrogén vagy sem.

Dolgozatom második felében a HoxI heterológ fehérje hatását mutatom be *T. roseopersicina*-ban. A HoxI a *R. eutropha* Hox-típusú hidrogenázának elektrontranszferben részt vevő dimer fehérjéje. Mivel a *T. roseopersicina* szintén rendelkezik Hox-típusú enzimekkel, feltételezhető volt, hogy a HoxI képes befolyásolni ezen hidrogenázok működését.

A *hoxI* gént plazmidon konjugálással juttattam be különböző hidrogenáz mutáns *T. roseopersicina* törzsekbe, a HoxI fehérje kifejeződését *T. roseopersicina*-ban Western

analízissal bizonyítottam. A HoxI protein jelenléte magas tioszulfát koncentráció mellett megnövelte a Hox1 hidrogenáz hidrogéntermelő aktivitását, ami azt bizonyítja, hogy a nagy mennyiségben jelenlévő tioszulfátot, mint elektrondonort a HoxI-vel kiegészített törzs hatékonyabban tudja hasznosítani, mint a Hox1 hidrogenáz önmagában.

A Hox1E alegység nélkül a Hox1 *in vivo* hidrogéntermelése megszűnik, bár az *in vitro* aktivitást nem befolyásolja a hiánya, *in vivo* nélkülözhetetlen ez a fehérje. A HoxI gazdaszervezetében hasonló funkciót tölt be, mint a Hox1E. A *hoxI* gént tartalmazó *hox1E* mutációs törzsön végzett aktivitásmérésekkel megállapítottam, hogy a HoxI nem képes heterológ módon átvenni a Hox1E funkcióját és visszaállítani a  $\Delta hox1E$  törzs *in vivo* hidrogéntermelő aktivitását.

Azért, hogy átfogó képet kapjunk a *hox1E* mutációjának és a heterológ *hoxI* gén bejuttatásának a globális génexpressziót befolyásoló hatásáról, három különböző törzsön teljes transzkriptom analízist végeztem: komplett Hox1 operont tartalmazó,  $\Delta hox1E$  mutáns és a *hoxI* gént tartalmazó  $\Delta hox1E$  törzseket használtam. Az eredmények két csoportra oszthatóak. A gének egy részének expressziós szintje lecsökkent a *hox1E* delécio hatására, mely alacsony expressziós szinteket a *hoxI* gén bevitele nem tudta helyreállítani. Ilyen a NADH dehidrogenáz 5-ös alegység génjével homológ gén, illetve egy hipotetikus transzmembrán fehérjét kódoló gén, amely a NADH-ubikinon oxidoreduktáz láncban résztvevő egyik fehérjével homológ. A másik csoportba tartozó gének kifejeződése szintén jelentősen lecsökkent a *hox1E* mutáns törzsben, azonban a *hoxI* gén jelenlétében ezen gének expressziója visszaállt az eredeti szintre (GB1121). A Hox1 és Hox2 hidrogenáz enimek struktúrgénjei, a fotoszintetikus reakció központ génjei, illetve a fénygyűjtő komplex elemeit kódoló gének tartoznak ebbe a csoportba.

A HoxI heterológ fehérje vizsgálata során tapasztaltak alapján kijelenthetem, hogy a HoxI nem képes átvenni a Hox1E hidrogenáz alegység szerepét *T. roseopersicina*-ban, azonban bizonyos gének expresszióját képes helyreállítani, amelyek a *hox1E* hiányában sérültek. Mindemellett meghatározott körülmények között a HoxI pozitívan befolyásolja a Hox1 hidrogenáz hidrogéntermelő aktivitását.

## XII. SUMMARY

Four active hydrogenases and one nitrogenase enzyme take important part in the hydrogen metabolism of the  $\gamma$  proteobacterium *Thiocapsa roseopersicina*. Hydrogenases of this microorganism have been studied in several aspects. Investigations were carried out on the biosynthesis, regulation and cellular function of different hydrogenases of our model organism, furthermore attempts were made for mapping the linkage of hydrogenases to other metabolic pathways in this prokaryotic organism.

The first part of the study reports on the function of the HupO protein. The *hupSL* operon contains an open reading frame, now denominated as *hupO*. The results of the experiments are presented to clarify the roles of the HupO in the cells. The HupSL is a typical uptake hydrogenase, which usually play role in recycling H<sub>2</sub> generated by the nitrogenase or present in the environment. First of all, the *hupO* gene was deleted from the *T. roseopersicina* genome using site directed deletion mutagenesis making available the selective investigation of the HupSL enzyme and the function of HupO in modulating the activity and expression of HupSL. Homologous complementation of the *hupO* mutations were carried out using a broad host range expression vector, the plasmid-borne *hupO* fully restored the original phenotype. Thus, the observed differences in the altered hydrogen uptake of HupSL in the *hupO* mutant could only be attributed to the lack of the *hupO* gene. Significantly higher *in vivo* and *in vitro* hydrogen uptake activities were observed in the absence of HupO under low thiosulphate conditions. We can induce electron shortage in the cells by applying low thiosulphate concentration in the growth medium. The increased HupSL hydrogen uptake in the absence of HupO coincided with a higher early growth rate of the respective *T. roseopersicina* strains under low thiosulphate conditions. The growth rate of the  $\Delta hupO$  strain was highly similar to that of the wild type *T. roseopersicina*. Similar trends and differences were observed in the transcription of *hupSL* genes and in the HupL protein synthesis in the investigated strains. The expression level of the HupSL hydrogenase strongly increased in response to *hupO* deletion, this phenomenon was more evident under low thiosulphate conditions. Similarly, the transcription of the *hupSL* genes increased by several orders of magnitude when the *hupO* gene was deleted from GB1131, the increase was observed both under low and high thiosulphate conditions.



It is to note, that the aforementioned changes of the HupSL activity and expression in the  $\Delta hupO$  strain were evident only in the absence of HynSL and Hox1 hydrogenases. The deletion of HupO influenced neither the *hupSL* gene expression nor the HupSL synthesis in strains harboring active Hox1. This observation suggests a sophisticated interconnection of the various NiFe hydrogenases in *T. roseopersicina*. The deletion of Hox1 bidirectional hydrogenase, which has a central role in the hydrogen metabolism of *T. roseopersicina*, results in strongly decreased HupSL synthesis. This decrease can be reverted by the deletion of the *hupO* gene. Thus, HupO has a mediating role between Hox1 and HupSL, the *hupO* gene supposedly encodes a repressor, which is active exclusively in the absence of Hox1.

Previous investigations revealed that the expression of the *T. roseopersicina* HupSL hydrogenase was independent of the presence or absence of molecular hydrogen, although all genes of the hydrogen-sensing regulatory hydrogenase were identified in the strain. The reason for the lack of hydrogen sensing is not completely clear, the *hupUV* genes were found to be silent under all tested conditions. However, clear hydrogen dependence of the HupSL expression was observed in the  $\Delta hupO$  strain in GB1131 background. The *hupO* mutant strain produced significantly more *hupL* transcripts and HupL protein in the presence of molecular hydrogen.

The results suggest a triple control of the HupSL hydrogenase in *T. roseopersicina*. Thiosulphate is the primary regulator, when thiosulphate concentration in the environment is high, the HupSL hydrogenase is efficiently repressed in all strains irrespective of the presence or absence of the *hupO* gene and of the presence of further hydrogenases in the cell. The *hupO* gene encodes a repressor acting as a second-level regulator. Moreover, hydrogen seems to serve as an additional modulator of Hup functions by influencing the *hup* expression in the *hoxI* mutant strain when the *hupO* gene coding for a putative repressor is deleted.

The investigation of the heterologous HoxI protein in *T. roseopersicina* was presented in the second part of the thesis. The HoxI protein is part of the functional *R. eutropha* Hox-type soluble hydrogenase, the HoxI homodimer is essential for the *in vivo* electron transfer to the soluble hydrogenase. Since *T. roseopersicina* also harbours Hox hydrogenases it was hypothesized that HoxI might influence the activity of these soluble enzymes and might complement the mutation of *hoxIE*. The *hoxI* gene was conjugated into different hydrogenase mutant *T. roseopersicina* strains using a broad host range expression vector.

The HoxI protein was detected by Western hybridization in the heterologous host. The introduction of HoxI into *T. roseopersicina* resulted in increased Hox1 hydrogen evolution activity under high thiosulphate conditions. This observation suggests that the HoxI together with the HoxI protein utilizes the available thiosulphate more efficiently than the native Hox1.

In-frame deletion of the *hox1E* gene abolished both the *in vivo* H<sub>2</sub>-producing and H-oxidizing activities of Hox1, however, the *in vitro* activities were not affected. The HoxI and the Hox1E are considered as electron transferring subunits of the Hox complex. Nevertheless, the HoxI could not replace Hox1E in *T. roseopersicina*, the *in vivo* hydrogenase activity was not restored in the *hox1E* mutant by introducing the *hoxI* gene. The global gene expression changes in *T. roseopersicina* were studied in three different strains (GB1121, GB1121  $\Delta$ *hox1E* and GB1121  $\Delta$ *hox1E* complemented with *hoxI*) using Next Generation Sequencing-based Whole Transcriptome Analysis. The results revealed differential expression of certain genes related to the hydrogen metabolism of *T. roseopersicina*. The expression levels of genes coding for the NADH dehydrogenase, subunit 5-like protein, and for a hypothetical transmembrane protein coupled to NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 5 homolog, significantly decreased in the *hox1E* deletion strain compared to GB1121. These decreased expression levels were not restored in the strain harboring the *hoxI* gene. We have observed another group of genes which also showed significantly decreased expression levels in the *hox1E* deletion strain (structural genes of the photosynthetic reaction center and genes of the light harvesting complex), interestingly the introduction of the *hoxI* gene restored the expression of these genes to the wild-type level. Similarly, the decreased expression levels of *hox1* and *hox2* structural genes in the *hox1E* deletion strain were restored in the presence of *hoxI* heterologous gene.

The study on the function of the *Ralstonia* HoxI protein in *T. roseopersicina* resulted in the following conclusions: the heterologous HoxI can not replace the role of Hox1E, although the introduction of *hoxI* influences the expression level of particular genes relevant in the hydrogen metabolism of *T. roseopersicina*. However, the presence of HoxI stimulate the Hox1 hydrogen evolution activity under specific conditions.

### **XIII. NYILATKOZAT**

Alulírott, Nagy Ildikó Katalin, kijelentem, hogy a jelen dolgozat alapjául szolgáló “HupO is a novel regulator involved in thiosulfate-responsive control of HupSL NiFe-hydrogenase synthesis in *Thiocapsa roseopersicina*” című tudományos publikációban megjelent eredményeket, valamint a “Temperature-dependent transformation of biogas-producing microbial communities points to the increased importance of hydrogenotrophic methanogenesis under thermophilic operation” című közleményben foglaltakat a szerzők nem használták fel tudományos fokozat megszerzéséhez.

Szeged, 2016. április 23.

Nagy Ildikó Katalin