

Hidrogenáz érés a *Thiocapsa roseopersicina* baktériumban

Fodor Barna

Témavezetők:

Prof. Kovács Kornél
Dr. Rákhely Gábor

MTA Szegedi Biológiai Központ, Biofizikai Intézet,
SZTE Biotechnológia Tanszék

Szeged

2003

Bevezetés

A fosszilis energiahordozók felhasználása során nagyban szennyezzük környezetünket, és hozzájárulunk a természet pusztulásához. Ráadásul ezek az energiahordozók lassan elfogynak. Ezek a problémák szükségessé teszik alternatív energiaforrások és energiahordozók felkutatását. Egyike a lehetséges megújuló energiaforrásoknak a Napunk, , míg a molekuláris hidrogén az egyik legjobb jelölt mint alternatív energiahordozó. Az utóbbi évtizedekben a biológia és biotechnológia gyors fejlődése megteremtette annak a lehetőségét, hogy a hidrogén termelését és felhasználását élőlények ill. azok izolált részeinek felhasználásával oldjuk meg. Azonban e célok megvalósításához elkerülhetetlennek látszik, hogy az eredeti, természetes rendszereket befolyásoljuk, módosítsuk vagy átrendezzük. Ilyen rendszerekben kulcsszerepet játszanak az ún. hidrogenáz enzimek, amelyek hidrogén reverzibilis oxidációját képesek katalizálni. Három csoportba sorolhatók: fémmentes hidrogenázok, csak vasat tartalmazó hidrogenázok, és nikkel-vas ([NiFe]) hidrogenázok. Az utóbbi csoport tagjaira jellemző, hogy a katalízisért felelős, két alegységből álló, heterodimert tartalmaznak. Ez egy elektronokat továbbító ún. kis-, és az aktív centrumot hordozó ún. nagy-alegységből áll össze. Az aktív centrum különös felépítésű. Egy Ni, Fe, CO és két CN^- csoportból épül fel. A kétatomos csoportok a Fe-on találhatóak, és a két fém a nagy-alegység négy konzervált ciszteinje koordinálja. Nem meglepő,

hogy az aktív centrum összeszereléséhez számos un. kisegítő-fehérje összehangolt működésére van szükség. A főbb lépéseket az inaktív, nagy-alegység bioszintézise, a CN^- és CO csoportok szintézise valamint a Fe, a kétatomos ligandok és a Ni beépítése jelenti. Ezeket a folyamatokat elsősorban az un. *hyp* gének által kódolt fehérjék végzik. A legutolsó lépésként a nagy alegység C-terminálisáról egy specifikus proteáz egy peptidet vág le.

Vonzó lehetőség a hidrogenázok használata fenntratható H_2 -termelésre vagy felhasználásra. Ilyenkor a stabilabb enzimek kerülnek előtérbe, hiszen könnyebben velük dolgozni az alkalmazásuk során.

A *Thiocapsa roseopersicina* egy Gram-negatív, anaerob fototróf, bíbor kénbaktérium, amely a Chromatiaceae családba tartozik. Legalább három [NiFe] hidrogenáza (HynSL, HupSL és HoxYH) van. Ezek közül a HynSL kiugróan stabil, hőtűrő ($> 80^\circ\text{C}$), ellenáll számos proteáznak és tolerálja az oxigént. A *T. roseopersicina* HynSL hidrogenáza (amelyet a *hynS-ispl1-ispl2-hynL* operon kódol) az egyik legígéretesebb jelölt a biotechnológiai alkalmazásra. Azonban a használatának a lehetőségét korlátozza az a tény, hogy eddig csak a saját gazdájában volt termeltethető a [NiFe] hidrogenázokra jellemző bonyolult érési folyamat következtében. Ennek a munkának tehát az volt a célja, hogy megkezdje az aktív HynSL hidrogenáz (és más hidrogenázok) termeléséhez nélkülözhetetlen komponensek azonosítását és jellemzését változatos módszerek felhasználásával.

A célunk volt:

- hidrogenáz aktivitásban sérült mutánsok előállítása, és a hidrogenáz érésben szerepet játszó gének azonosítása a *T. roseopersicina* baktériumban
- megérteni hogyan működnek együtt az érésben szerepet játszó gének termékei egy összehangolt “fehérje-gépezetet” alkotva
- kifejleszteni a mutánsok létrehozásához és azonosításához valamint fehérje-fehérje kölcsönhatások kimutatásához szükséges módszereket

Módszerek

A DNS manipulációt és analízist az általános gyakorlatnak megfelelően végeztem. Egy konjugációra épülő génátviteli rendszert optimalizáltam és használtam módosított DNS molekulák *T. roseopersicina*-ba való bejuttatásához. Irányított és transzpozonos mutagenézist fejlesztettem ki és használtam a mutánsok előállításához. A hidrogenáz aktivitásban sérült transzpozonos mutánsok izolálására egy telepek hidrogenáz aktivitását kimutató módszert terveztem és használtam. A különböző törzsek enzim aktivitását egy hidrogenáz enzim aktivitást mérő módszerrel határoztam meg. A 6His- és (FLAG-tag Strep-tag II)- toldalékokkal

ellátott fehérjék tisztítását a gyártó utasításai szerint végeztem. A fehérjék analízise natív és denaturáló polyacrylamid géleken történt. A toldalékkal ellátott fehérjékkel együtt kitisztított fehérjék analízisét MALDI-TOF MS-el végeztük. A szekvencia adatokat számítógéppel elemeztük.

Eredmények

1 Kifejlesztettem egy konjugáción alapuló gén-átviteli rendszert a *T. roseopersicina* nevű fotoszintetikus baktériumra. Ez egy alapvető eszköz módosított DNS bevitelére a baktérium sejtjeibe, és ezen sejtek genetikai megváltoztatására. Így a *T. roseopersicina*-val kapcsolatos számos tudományos kérdés vizsgálatára nyílik lehetőség.

2 Kifejlesztettem egy transzpozonos mutagenézis rendszert *T. roseopersicina*-ra. Ez lehetővé teszi olyan mutánsoknak közvetlen kiválasztását, amelyekben csak egyszer épült be a transzpozon. A transzpozon megjelöli az elrontott gént, így egyszerűsítvén annak azonosítását. Ez az első szakirodalomban is leközölt transzpozonos mutagenézis rendszer bíbor kénbaktériumokra, amely remélhetőleg hasznos eszköznek bizonyul az ebbe a csoportba tartozó baktériumok számos biológiai folyamatának vizsgálatában.

3 Megterveztem és összeraktam széles gazda-specifikusságú, fehérjék termelésre használható plazmidokat, amelyek számos

affinitás toldalék használatát is lehetővé teszik (pMHE* plazmidok). Így lehetőség nyílik affinitás toldalékkal összeépített fehérjék termeltetésére, amelyek könnyen kimutathatók és kitisztíthatók. Megmutattuk, hogy ezen plazmidok többféle baktériumban is használhatóak, ha a megfelelő, törzs-specifikus promóter irányítja a termelést. Ezen plazmidok bizonyára használhatóak lesznek számos más Gram negatív baktériumban, amikor gazda-specifikus fehérje-termelésre van szükség különböző affinitás toldalékokkal.

4 Megmutattam, hogy a pMHE* plazmidok gazda-specifikus promóterrel kiegészítve használhatóak mind *Escherichia coli*-ból mind pedig a másik gazdából fehérje tisztítás során. Így szükségtelen különböző fehérje-termelő plazmidokat készíteni, amikor párhuzamosan szeretnénk *E. coli*-ból és egy másik baktériumból ugyanazt a fehérjét kitisztítani.

5 Bizonyítottam, hogy a pMHE* plazmidokról termeltetett toldalékkal ellátott fehérjékkel kölcsönható más fehérjék együtt kitisztíthatóak. Ennek bemutatására a *T. roseopersicina* toldalékkal ellátott HupK fehérjéjével kölcsönható GroEL-szerű fehérjét tisztítottam ki. Ez a megközelítést remélhetőleg más Gram negatív baktériumban is használható lesz fehérjék közti kölcsönhatások kimutatására.

6 Elkészítettem egy *T. roseopersicina* miniTn5 mutáns könyvtárat, és kidolgoztam a hidrogenáz mutánsok kimutatásra szolgáló

módszert. Hat független, hidrogenáz aktivitásban sérült transzpozon-mutánst izoláltam. Ezeket két mutáns csoportba lehetett besorolni. Az első csoport tagjaiban a mutáció pleiotróp volt az összes hidrogenázra nézve, míg a másik csoportba tartozók HynSL (stabil hidrogenáz) specifikus mutánsok voltak.

7 Azonosítottam a *hypF* gént, valamint bebizonyítottam, hogy a mutációja a *T. roseopersicina* összes hidrogenázát érinti.

8 Heterológ komplementációs kísérletekkel bizonyítottam, hogy a különböző baktériumok *hypF* génjei bizonyos mértékig kicserélhetőek. Ezek az adatok bizonyítják, hogy lehetséges különböző baktériumok *hyp* génjeit használni, ha heterológ próbálunk hidrogenáz enzimeket termeltetni, de kellő körültekintéssel kell eljárunk.

9 Bizonyítottam, hogy az *isp1* és *isp2* eltávolítása a *hynS-isp1-isp2-hynL* operonból nincs hatással a működőképes HynSL hidrogenáz elkészítésére. A kísérletek során hidrogenáz enzim aktivitást határoztam meg olyan törzsek membrán-frakciójából, amelyek vagy a vad típusú operont, vagy annak *isp1-2* nélküli változatát hordozták.

10 Megmutattam, hogy a HypC₂ és a HynL fehérjék közvetlenül kölcsönhatnak a működőképes HynSL hidrogenáz létrehozásához vezető érési folyamat során. Ezen kísérletekben a toldalékkal ellátott HypC₂ fehérjét egy $\Delta hypC_2$ *T. roseopersicina* törzsben termeltettem.

A toldalékkal ellátott fehérje komplementálta a mutációt. A toldalékkal ellátott HypC₂-vel együtt volt kitisztítható a HynL fehérje. Így azt a következtetést vontuk le, hogy a HypC₂ fehérje egy HynL specifikus chaperone.

11 Megmutattam, hogy a HupK nevű hidrogenáz érésben szerepet játszó fehérje kölcsönhat egy GroEL-szerű fehérjével. A GroEL-szerű fehérje hidrogenáz érésben betöltött lehetséges szerepét tárgyaltam.

Közlemények

A disszertáció alapjául szolgáló közlemények:

1. **Fodor, B. D., Á. T. Kovács, R. Csáki, É. Hunyadi-Gulyás, É. Klement, G. Maróti, L. S. Mészáros, K. F. Medzihradszky, G. Rákhely, and K. L. Kovács.** 2003. Modular broad-host-range expression vectors for single protein and protein complex purification. Submitted to *Appl. Environ. Microbiol.*
2. **Maróti, G., B. D. Fodor, G. Rákhely, Á. T. Kovács, S. Arvani, and K. L. Kovács.** 2003. Accessory proteins functioning selectively and pleiotropically in the biosynthesis of [NiFe] hydrogenases in *Thiocapsa roseopersicina*. *Eur. J. Biochem.* 270:2218-2227.
3. **Fodor, B., G. Rákhely, Á. T. Kovács, and K. L. Kovács.** 2001. Transposon mutagenesis in purple sulfur photosynthetic bacteria: identification of *hypF*, encoding a protein capable of processing [NiFe] hydrogenases in alpha, beta, and gamma subdivisions of the proteobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:2476-2483.

Egyéb közlemények

4. **Rákhely, G., Á. T. Kovács, G. Maróti, B. D. Fodor, Gy. Csanádi, D. Latinovics, and K. L. Kovács.** 2003. A cyanobacterial type, heteropentameric NAD⁺ reducing [NiFe] hydrogenase in the purple sulfur photosynthetic bacterium, *Thiocapsa roseopersicina*. Submitted to *Appl. Environ. Microbiol.*
5. **Kovács K.L., B. D. Fodor, Á. T. Kovács, Gy. Csanádi, G. Maróti, J. Balogh, S. Arvani, and G. Rákhely.** 2002. Hydrogenases, accessory genes and the regulation of [NiFe] hydrogenase biosynthesis in *Thiocapsa roseopersicina*. *Int. J. Hydrogen Energy* 27:1463-1469.
6. **Kovács, K. L., C. Bagyinka, L. Bodrossy, R. Csáki, B. Fodor, K. Györfi, T. Hanczár, M. Kálmán, J. Ósz, K. Perei, B. Polyák, G. Rákhely, M. Takács, A. Tóth, and J. Tusz.** 2000. Recent advances in biohydrogen research. *Pflügers Arch.* 439:R81-R83.
7. **Dahl, C., G. Rákhely, A. S. Pott-Sperling, B. Fodor, M. Takács, A. Tóth, M. Kraeling, K. Györfi, Á. Kovács, J. Tusz, and K. L. Kovács.** 1999. Genes involved in hydrogen and sulfur metabolism in phototrophic sulfur bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 180:317-324.