NiFe hidrogenázok és fotoszintetikus rendszer kifejeződését szabályozó szignál transzdukciós mechanizmusok *Thiocapsa roseopersicina*-ban

Ph.D. tézisek

Kovács Ákos Tibor

Témavezetők:

Dr. Rákhely Gábor
Prof. Kovács L. Kornél

Magyar Tudományos Akadémia
Szegedi Biologia Központ, Biofizikai Intézet
Szegedi Tudományegyetem, Biotechnologiai Tanszék

Szeged
2003

Bevezetés

Azalatt a 3 milliárd év alatt, amíg a baktériumok a Földön megtelepedtek változatos és bámulatos mechanizmusokat hoztak létre, hogy a különböző környezeti feltételekhez alkalmazkodjanak. Az adaptáció során érzékelniük kell a környezeti jeleket, és ki vagy be kell kapcsolniuk a különböző metabolikus útvonalakat a génjeik illetve operonjaik kifejeződésének megváltoztatásával.

A *Thiocapsa roseopersicina* a fotoszintetikus kén bíbor baktériumok, a *Chromatiaceae* családjába tartozik. A *Chromaticeae* család tagjai képesek oxigén mentes környezetben fotoszintetizálni, redukált kénvegyületeket használni elektron donorként és a levegő nitrogénjét megkötni.

Az oxigén jelenléte a fény jelenlétében az anaerob fotoszintetikus bíbor kén és nem kén baktériumok számára mérgező a reaktív oxigén gyökök miatt. Emiatt több szintű és párhuzamos rendszerek jöttek létre, amelyek a fotoszintetikus rendszer keletkezésében szerepet játszó operonokat represszálják vagy kifejeződésük aktivációját megszüntetik. Más esetekben, ahol oxigén jelenlétében maximális az energianyerés (pl. *Escherichia coli*-ban), a különböző anaerob metabolikus útvonalakban résztvevő enzimek csak oxigén jelenlétében fejeződnek ki. Az oxigén mennyiségének csökkenésével az anaerob metabolizmusban részt vevő fehérjéket kódoló gének kifejeződése nő, míg az aerob metabolizmusban szereplőké csökken.

A baktériumokban történő oxigén mentes fotoszintézis a fény energiáját ciklikus elektron áramláson keresztül közvetíti. Ez a folyamat energiát termel a mikrobáknak, de nem biztosít elektront a széndioxid vagy $NAD^+ \rightarrow NADH+H^+$ redukciója számára. Így ezek a fotoszintetikus mikroorganizmusok további elektront igényelnek, amelyek lehetnek szerves anyagok, redukált (kén) komponensek, hidrogén gáz, stb. A hidrogént több baktérium használja, emellett a H_2-nek több funkciója lehet: elektront és energiát is szolgáltathat a sejtek számára.

Egy adott fehérje fiziológiai funkciójának felderítésére, a kifejeződésének vizsgálata egy hasznos megközelítés lehet. A legfontosabb bioenergetikai és redox folyamatok közül, én a fényenergia konzervációjában fontos rendszereket és a hidrogén metabolizmust és azok génjeinek kifejeződését vizsgáltam *Thiocapsa roseopersicina*-ban.

Fő céljaim, a fotoszintézis/pigment bioszintézisben szereplő komponensek azonosítása és azon szabályozó rendszerek tanulmányozása, amelyek a fotoszintetikus pigment szintézis és a különböző hidrogenázok kifejeződését befolyásolják.

Módszerek

A DNS manipulációja és annak analízise az általános technikák vagy a gyártók specifikációja szerint történtek. *T. roseoprsicina*-ba és *R. capsulatus*-ba a plazmidokat konjugáció segítségével juttatam be. Helyspecifikus és random transpozonos mutagenezist használtunk a mutánsok létrehozására. A primer extenziót és a RT-PCR-t végeztünk a transkripciós iniciációs pont meghatározására és a specifikus mRNS-ek detektálására. A karotenoidokat aceton-metanol extrakciót követően UV spektrofotométerrel vizsgáltuk. A LacZ méréseket toluén segítségével permeabilizált sejteken alkalmaztunk. A 6His aminosav láncot tartalmazó fehérjéket a gyártók specifikációja szerint tisztítottam. A fehérje-DNS kölcsönhatásokat gél retardációs kísérletekben vizsgáltam. A DNS és fehérje szekvencia összehasonlításokat web-es és helyi bioinformatikai programokkal végeztem.

Eredmények

Eredményeimet az alábbiakban foglalom össze:

I. Plaszpozonos mutagenezis segítségével izoláltam egy pigment mutáns *Thiocapsa roseopersicina* törzset. A plaszpozon a *crtD* génbe inszertálódott, ennek megfelelően a spirilloxantin bioszintézis útvonala sérült.

II. A plaszpozont határoló 22 kb kromoszómális régióban 19 nyitott leolvasási keretet azonosítottam, amelyek karotenoid, bakterioklorofill és a fotoszintetikus reakció centrum keletkezésében vesznek részt. A *crtCDEF* gének mellett, bizonyítottam a *crtI* gén jelenlétét, így leírva szinte mindegyik spirilloxantin bioszintézisben szerepet játszó gént *T. roseopersicina*-ban.

III. A spirilloxantin bioszintézist a *crtDC* gének bevitelével helyre tudtam állítani a mutáns törzsben. A *Rubrivivax gelatinosus crtDC* génekkel történt heterológ komplementációs kísérletek azt bizonyítják, hogy a CrtI és CrtC enzimek speciális tulajdonságaitól függ, hogy a bíbor baktériumokban spirilloxantin vagy szferoidén keletkezik.

IV. A karotenoid bioszintezisben szereplő, a *crtDC* és *crtE* gének kifejeződését az oxigén szabályozza, amelyben a CrtJ represszornak lehet szerepe.

V. A HynSL hidrogenáz kódoló operonban található *isp*1 és *isp*2 gének a kis és nagy alegység génjeivel együtt íródnak át.

VI. A *hynS* gén előtt 5` irányban 3 transzkripciós iniciációs pontot azonosítottam. A génhez közelebbi ponttól 5` irányban egy nem tipikus -24/-12 promótert azonosítottam, míg a távolabbi iniciációs pontoktól 5` irányban nem lehet tipikus promóter szekvenciát azonosítani.

VII. Bizonyítottam az oxigén szerepét a *hyn* operon kifejeződésében, mind saját gazdában, *T. roseopersicina*-ban, mind heterológ gazdákban, *Escherichia coli*-ban és *Rhodobacter capsulatus*-ban. Minden törzsben ugyaz a 5` aktiváló régió bizonyult fontosnak a teljes kifejeződéshez.

VIII. Bemutattam az FNR fontos szerepét a heterológ gazdákban.

IX. *T. roseopersicina*-ban azonosítottam és izoláltam a *fnrT* gént.

X. Az 5` aktiváló régióban található FNR kötő fél hely elrontásával bizonyítottam annak nélkülözhetetlen szerepét az oxigén mentes környezetben megfigyelhető teljes mértékű kifejeződésben.

XI. Megfigyeltem a *hup* operon minimális oxigén általi szabályozottságát.

XII. A *hup* operon expressziója a hidrogén jelenlététől függetlenül állandónak bizonyult. Bizonyítottam, hogy a *hupR* gén jelenléte nélkülözhetetlen a *hupSL* operon kifejeződéséhez.

XIII. Azonosítottam a hidrogén érzékelő szignál transzdukciós kaszkád elemeit. Bemutattam, hogy a *hupTUV* kifejeződésének hiánya okozza a *hup* operon állandó transzkripcióját.

XIV. Sikerült visszaállítanom a hidrogén függő kifejeződését az aktívan expresszált *T. roseopersicina* és *R. capsulatus hupTUV* gének bevitelének segítségével.

Közleméyek

A tézishez kapcsolódó közlemények:

1. Kovács, Á.T., Rákhely, G., & Kovács, K.L. (2003). Genes involved in the biosynthesis of photosynthetic pigments in the purple sulfur photosynthetic bacterium *Thiocapsa roseopersicina. Appl Environ Microbiol* **69**, 3093-3102.

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

3. Kovács, Á.T., Rákhely, G., & Kovács, K.L. (2003). Anaerobic, FNR linked regulation of the thermophilic hydrogenase operon in *Thiocapsa roseopersicina* and heterologous hosts. *Microbiology, UK elfogadva***.**

Más közlemények:

4. Maróti, G., Fodor, B. D., Rákhely, G., Kovács, Á. T., Arvani, S. & Kovács, K. L. (2003). Accessory proteins functioning selectively and pleiotropically in the biosynthesis of [NiFe] hydrogenases in *Thiocapsa roseopersicina. Eur J Biochem* **270,** 2218-27.

5. Fodor, B., Rákhely, G., Kovács, Á. T. & Kovács, K. L. (2001). Transposon mutagenesis in purple sulfur photosynthetic bacteria: identificationof *hypF*, encoding a protein capable of processing [NiFe] hydrogenases in alpha,beta, and gamma subdivisions of the proteobacteria. *Appl Environ Microbiol* **67,** 2476-83.

6. Dahl, C., Rákhely, G., Pott-Sperling, A. S., Fodor, B., Takács, M., Tóth, A., Kraeling, M.,Győrfi, K., Kovács, Á., Tusz, J. & Kovács, K. L. (1999). Genes involved in hydrogen and sulfur metabolism in phototrophic sulfur bacteria. *FEMS Microbiol Lett* **180,** 317-24.

7. Fodor, B. D., Kovács, Á. T., Csáki, R., Hunyadi-Gulyás, É., Klement, É., Maróti, G., Mészáros, L. S., Medzihradszky, K. F., Rákhely, G., Kovács, K. L. (2003). Modular broad-host-range expression vectors for the purification of proteins and protein complexes and their application. *Appl Environ Microbiol elfogadva.*

8. Rákhely, G., Kovács, Á. T., Maróti, G., Fodor, B. D., Csanádi, Gy., Latinovics, D., Kovács, K. L. (2003). A cyanobacterial type, heteropentameric NAD^+ reducing [NiFe] hydrogenase in the purple sulfur photosynthetic bacterium, *Thiocapsa roseopersicina. Appl Environ Microbiol elfogadva.*

Poszterek:

1. Kovács, Á. T., Rákhely, G., Balogh, J., Maróti, G., Latinovics, D., Kovács, K. L. (2003). Characterization of signal transduction cascades responsible for the control of the expression of NiFe hydrogenases and photosynthetic apparatus in purple sulfur

photosynthetic bacteria. Poszter: 11th International Symposium on Phototrophic Prokaryotes, augusztus 24-29, Tokyo, Japán.

2. Kovács, Á. T., Rákhely, G., Moura, J., Balogh, J., Maróti, G., Kovács, K. L. (2002). Regulatory mechanisms controlling the expression of genes encoding the membrane bound hydrogenases in *Thiocapsa roseopersicina.* Poszter: COST 841 Workshop on the Biosynthesis and regulation of hydrogenases, október 5-8, Cercedilla, Spanyolország.

3. Fodor, B. D., Rákhely, G., Kovács, Á. T., Kovács, K. L. (2002). Genes and gene products of the operon (*hynS-isp1-isp2-hynL*) coding for the stable hydrogenase of *Thiocapsa roseopersicina.* Poszter: COST 841 Workshop on the Biosynthesis and regulation of hydrogenases, október 5-8, Cercedilla, Spanyolország.

4. Maróti, G., Fodor, B. D., Rákhely, G., Kovács, Á. T., Arvani, S., Kovács, K. L. (2002). Unusual features and organization of the [NiFe] hydrogenase accessory genes in *Thiocapsa roseopersicina*. Poszter: COST 841 Workshop on the Biosynthesis and regulation of hydrogenases, október 5-8, Cercedilla, Spanyolország.

5. Rákhely, G., Csanádi, Gy., Fodor, B. D., Kovács, Á. T., Maróti, G., Latinovics, D., Kovács, K. L. (2002). Characterization of the operon coding for the soluble heteropentameric [NiFe] hydrogenase in the photosynthetic bacterium, *Thiocapsa roseopersicina.* Poszter: COST Action Workshop on Biosynthesis and regulation of hydrogenases, október 5-8, Cercedilla, Spanyolország.

6. Kovács Á. T., Rákhely, G., Kovács, K. L. (2002). Global signal transduction cascade coupled to anaerobiosis regulates the expression of the stable hydrogenase in *Thiocapsa roseopersicina*. Poszter: Biohydrogen 2002 Conference, április 21-24, Ede, Hollandia.

7. Rákhely, G., Csanádi, Gy., Fodor, B. D., Kovács, Á. T., Maróti, G., Balogh, J., Kovács, K. L. (2002). Genes encoding for soluble [NiFe] hydrogenases in the photosynthetic bacterium, *Thiocapsa roseopersicina*. Poszter: Biohydrogen 2002 Conference, április 21-24, Ede, Hollandia.

8. Kovács, Á. T., Rákhely, G., Kovács, K. L. (2001). Regulation of the stable hydrogenase biosynthesis of *Thiocapsa roseopersicina* in homologous and heterologous hosts. Poszter: COST Action 841 *and* IEA Annex 15 joint workshop, szeptember 7-12, Szeged, Magyarország.

9. Kovács, Á., Rákhely, G., Kovács, K. L. (2000). Expression analysis of the hydrogenases in *Thiocapsa roseopersicina*. (PR6.) Poszter: Proc. 6th Int. Conf. on the Molecular Biology of Hydrogenases, augusztus 5-10, Potsdam, Németország.

10. Fodor, B., Rákhely, G., Kovács, Á., Kovács, K. L. (2000). The *hypF* gene of *Thiocapsa roseopersicina* is pleiotropic in its host, and functions universally in other bacteria. (PR8.) Poszter: Proc. 6th Int. Conf. on the Molecular Biology of Hydrogenases, augusztus 5-10, Potsdam, Németország.