

**MEZOFIL ÉS HIPERTERMOFIL EREDETŰ  
TERMOSTABIL HIDROGENÁZOK MOLEKULÁRIS  
BIOLÓGIÁJA**

Ph. D. tézis

Készítette:

**Dr. R á k h e l y G á b o r**

MTA Szegedi Biológiai Központ  
Biofizikai Intézet

1997



# TARTALOM

	oldal
I. BEVEZETÉS .....	1
II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS, .....	3
ELŐZMÉNYEK	
II/1. A hidrogenázok általános jellemzése .....	3
II/2. Hidrogenáz gének szerveződése, .....	7
segédgének, szabályozás	
II/3. Kristályszerkezet .....	9
II/4. Hidrogenáz(ok) .....	10
a <i>Thiocapsa roseopersicina</i> -ban	
II/5. Hipertermofil mikroorganizmusok .....	11
és hidrogenázaik	
III. CÉLKITÚZÉS .....	15
IV. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK .....	17
V. 1. TÉZISPONT .....	20
A <i>T. roseopersicina</i> stabil hidrogenázát	
kódoló gének izolálása és jellemzése	
V/1. A gének izolálása .....	20
V/2. A <i>hydS</i> és <i>hydL</i> jellemzése .....	23
V/3. Közbeékelődött szekvencia (KÉSZ) .....	25
V/4. 5' és 3' irányú környező szekvenciák .....	26
V/5. A két hidrogenáz feltételezett funkciója ...	26
a <i>T. roseopersicina</i> -ban	
VI. 2. TÉZISPONT .....	27
A <i>T. litoralis</i> hidrogenáz kódoló gének	
izolálása és jellemzése	
VI/1. A gének izolálása .....	27
VI/2. A hidrogenáz gének jellemzése .....	29
VI/3. A <i>T. litoralis</i> és a <i>P. furiosus</i> .....	29
hidrogenáz génjei hasonlóak egymáshoz	
VI/4. Létezik egy második nukleotid .....	31
kötő domén a $\gamma$ alegységen belül	

VI/5. A <i>T. litoralis</i> hidrogenáz génektől .....	33
5' irányban szomszédos gén egy formát-dehidrogenázt kódoló gén	
VI/6 . A <i>T. litoralis</i> hidrogenáz génjei egy ....	34
transzkripciót képeznek, és az expressziót a kén nem befolyásolja	
VI/7. A <i>T. litoralis</i> hidrogenáz .....	34
mRNS-e egy hosszú nem transzlálódó régiót tartalmaz	
VI/8. A <i>Thermococcales</i> hidrogenázok .....	36
külön csoportot képeznek	
VII. 3. TÉZISPONT .....	38
Módszer kifejlesztése hipertermofil mikroorganizmusok izolált telepeiben való tenyésztésére	
VII/1. Bevezetés .....	38
VI/2. Phytigel és alginát keveréke a .....	38
megoldás magas hőmérsékleten is stabil lemezek előállítására	
VIII. ÖSSZEFOGLALÁS .....	41
IRODALOM .....	45
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....	49

## I. BEVEZETÉS

66 évvel ezelőtt Stephenson és Stickland mutatta ki *Escherichia coli*-ban olyan enzim jelenlétét, amely képes molekuláris hidrogén keletkezését eredményező reakciót katalizálni. Az enzimet hidrogenáznak nevezték el, és azóta nagyon sok mikroorganizmusban, többnyire prokariótákban találtak ilyen enzim(ek)et. Fiziológiai szerepük nagyon eltérő. A hidrogenáz aktivitás olyan alapvető sejtfunciókhoz kapcsolódik, mint sejtlégzés, fotoszintézis, nitrogén fixálás, metanogenezis stb. Természetes, hogy a sokrétű felhasználási lehetőség miatt a hidrogenáz enzimet a biotechnológia számos területén komoly ígéretként tartják számon. Indirekt hasznosításokban mint biológiai redukálószer előállító katalizátor (pl. nitrát redukció, metán termelés) játszik fontos szerepet. 20-30 éves távlatban a fosszilis energiahordozó készletek elkerülhetetlen kimerülésével a hidrogén, mint energiahordozó fog előtérbe kerülni. A technológiai szerkezetváltásban a napenergia átalakításával biológiai úton termelt hidrogén az előrejelzések szerint meghatározó jelentőségű lesz. A gyakorlati hasznosítások fejlesztését nehezíti, hogy a hidrogenázok fémeket tartalmazó fehérjék, amelyek a biológiai környezetükből kiemelve általában gyorsan elvesztik aktivitásukat. Az ismert hidrogenázok többsége 1 Ni és 8-24 Fe atomot tartalmaz, az utóbbiak általában  $Fe_4S_4$  kockákba rendeződnek.

A *Thiocapsa roseopersicina* egy bíbor, redukált kénvegyületeket hasznosító fotoszintetizáló baktérium, amely szükség esetén képes a levegő nitrogénjét is megkötni. A legtöbb, hidrogenáz enzimmel rendelkező mikroorganizmussal ellentétben a *T. roseopersicina* egy olyan hidrogenázt tartalmaz, amelyet jelentős hőstabilitás,  $O_2$ -el és proteolitikus hasítással szemben szokatlanul erős rezisztencia jellemez. Ezek a tulajdonságai kiemelt jelentőségűvé teszik mind biotechnológiai, mind alapkutató szempontjából. Laboratóriumunk molekuláris biológiai módszerekkel néhány éve azonosított a *T. roseopersicina*-ban egy hidrogenázt kódoló gén családot, amelyről azonban kiderült, hogy nem a stabil hidrogenáz megfelelő szekvenciáit hordozza. Fehérje szinten sikerült nitrogén fixáló körülmények között kimutatni e gének termékét, amely a többi ismert hidrogenázhoz hasonlóan meglehetősen instabillnak bizonyult. Ez a fototróf, mezofil mikroorganizmus tehát tartalmaz egy szokatlanul stabil valamint egy labilis hidrogenázt. A két, hasonló felépítésű és azonos reakciót katalizáló enzim



molekuláris biológiai illetve biokémiai összehasonlítása révén betekínthetést nyerhetünk az enzimet stabilizáló molekuláris mechanizmusokba. Teljesebbé teszi a képet egy olyan termostabil hidrogenázzal való összehasonlítás, amely termofil mikroorganizmusból származik.

A *Thermococcus litoralis* egy hipertermofil archaeon, amely anaerob módon 55-98 °C-on szaporodik, és tartalmaz egy citoplazmatikus Ni-Fe hidrogenázt, amely - a mikroorganizmus növekedési hőmérsékletéből adódóan - nagyfokú termostabilitással rendelkezik. A fehérjét partnereink tisztították és részlegesen jellemezték, így ígéretes jelölt a *T. roseopersicina* hidrogenázaival való molekuláris biológiai összehasonlításra.

A dolgozatban bemutatjuk a

- *T. roseopersicina* stabil hidrogenáz génjeinek izolálását és a fehérjét kódoló gének szekvenciáját. Kimutatjuk, hogy ezek a gének a hidrogenázokra általánosan jellemző elrendeződéstől eltérő módon szerveződnek.
- *T. litoralis* hidrogenázt kódoló gének molekuláris biológiai jellemzését, valamint a nagy valószínűséggel formát-dehidrogenázt kódoló szomszédos gént.
- a *T. roseopersicina* két hidrogenázát, valamint a *T. litoralis* hidrogenázát kódoló gének szekvencia analízisét.

Rekombináns hidrogenázok előállítására mind biotechnológiai, mind az alap kutatás szempontjából alapvető fontosságú, ezen belül a hőstabil rendszerek kifejlesztése kiemelt jelentőségű. A hipertermofil mikroorganizmusokban való genetikai manipulációk még nagyon kezdetleges stádiumban vannak, hisz olyan technikai problémák merülnek fel, mint izolált telepek formájában szilárd felületen való tenyésztés, ami nélkül a rekombináns technikák csak nagyon nehezen alkalmazhatók.

- A dolgozat bemutat egy általunk kifejlesztett eljárást, amely alkalmas hipertermofil mikroorganizmus telepek magas hőmérsékleten, lemezen történő növesztésére. Ez az első lépések egyike a hipertermofil genetikai rendszerek kifejlesztésére irányuló erőfeszítéseknek.

## II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS, ELŐZMÉNYEK

### II/1. A hidrogenázok általános jellemzése

A hidrogenázok olyan enzimek, amelyek valamilyen elektron donor vagy akceptor közreműködésével a következő redox reakciót katalizálják:

$H_2 \Leftrightarrow 2H^+ + 2 e^-$ . Aktív centrumában fémionok találhatóak, ezek minőségétől függően két nagy csoportba oszthatóak [15, 41, 47]: a; a csak Fe-t tartalmazó és b; a Ni-Fe-t tartalmazó hidrogenázokra. Ez utóbbi osztályon belül még létezik egy alcsoport, amelyek Ni-Fe-Se tartalmú enzimek, de ezek száma lényegesen csekélyebb. A csak Fe-t tartalmazó hidrogenázok általában hatékonyabbak a hidrogén fejlesztés irányában, a Ni-Fe enzimek inkább a hidrogén elbontás (oxidáció) irányában működnek, bár a két folyamat aránya meglehetősen széles tartományban mozoghat [1, 31]. A Ni-Fe hidrogenázok között is vannak olyanok, amelyek kizárólag a hidrogén felhasználás irányában, míg mások a hidrogén fejlesztés és a  $H_2$  bontás irányában is képesek katalizálni a környezeti feltételektől függően (reverzibilis, vagy kétirányú hidrogenázok). Érdekes módon a hipertermofil Ni-Fe hidrogenázok lényegesen aktívabban katalizálják a  $H_2$  fejlesztéssel járó reakciót, mint a mezofil társaik [46]. Ennek oka az eltérő élettani szerepükben keresendő. Mivel a kutatásaink tárgyát képező *T. roseopersicina* és *T. litoralis* hidrogenázok a Ni-Fe enzimek közé tartoznak, a dolgozatban a csak Fe-t tartalmazó hidrogenázokra nem térünk ki a továbbiakban részletesen [1].

Hidrogenázt elsősorban különböző típusú prokariótákból izoláltak, mint pl. szulfát redukáló baktériumok (*Desulfuvibrio gigas*),  $N_2$  fixáló baktériumok, (*Bradyrhizobium japonicum*), fotoszintetizáló baktériumok (*Rhodobacter capsulatus*, vagy *T. roseopersicina*), cianobaktériumok (*Anabaena*, *Nocardia*) stb [15, 41]. Egyre több hidrogenázt azonosítanak archaeabaktériumokban, erre példa a metanogén *Methanobacterium thermoautotrophicum* és a *Methanococcus voltae* valamint néhány eukariótában [15, 41, 48]. A különböző mikroorganizmusokban a hidrogenázok élettani szerepe eltérő, sőt ez függ a külső környezettől, a növekedési körülményeitől is. Például ha *Desulfuvibrio* sejtvonalat szulfát mentes körülmények között tenyésztünk, a kultúra  $H_2$ -t termel, míg szulfát jelenlétében az elektronok a szulfát redukcióját eredményezik. Fotoszintetizáló baktériumokban a hidrogenázok a fotoszintézis elektronigényét biztosíthatják a  $H_2$  oxidációjával, a



metanogének esetén a hidrogenázoknak a CO<sub>2</sub> metánná történő redukációjában van szerepük, a nagy kémiai energia igényű nitrogén fixálás során pedig a nitrogénáz enzimkomplex által feleslegben termelt hidrogén újrahasznosítása a fő feladat, amely a bioenergetikai egyensúlyt javítja. A hipertermofil *Thermococcales* törzsek esetén a hidrogenázok elsődleges feladata a heterotrof növekedés során a cukrok, peptidek fermentatív lebontásakor feleslegben képződő elektronok eltávolítása H<sub>2</sub> gáz, vagy H<sub>2</sub>S formában [2].

A hidrogenázok a sejten belül három fő helyen lokalizálódhatnak, ennek megfelelően változnak szerkezeti tulajdonságaik is .

- 1., a citoplazmában, mint pl. az *Alcaligenes eutrophus* egyik hidrogenáza,
- 2., a periplazmában, erre példa a *D. gigas*,
- 3., a membránhoz kötötten, ami pl. a fotoszintetizáló *Rhodobacter capsulatus*-ra, vagy a *T. roseopersicina*-ra jellemző [15, 31].

Az előfordulási hely valamint az aminosav szekvenciák hasonlósága alapján a hidrogenázok a ma legszélesebb körben használt felosztás szerint az alábbi csoportokba sorolhatók [47]:

- I. H<sub>2</sub> oxidáló, membrán kötött Ni-Fe hidrogenázok, pl. *R. capsulatus*, *T. roseopersicina* stb.
- II. H<sub>2</sub> oxidáló Ni-Fe(-Se), többnyire a periplazmában található hidrogenázok, pl. *D. gigas*.
- III. Anaerob, csak Fe-t tartalmazó hidrogenázok, a periplazmában pl. a *D. vulgaris*, a citoplazmában pl. a *Clostridium pasteurianum*.
- IV. F420-, MV- és NAD-t redukáló citoplazmatikus hidrogenázok, pl. *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Alcaligenes eutrophus*.
- V. Labilis H<sub>2</sub> termelő hidrogenáz. Egyetlen példa az *E. coli* egyik hidrogenáza.
- VI. Trícium kicserélődést katalizáló citoplazmában lokalizált hidrogenázok, pl. *Anabaena*, *Synechococcus*.

Valószínűleg ez az osztályozás tovább fog bővülni újabb és újabb fehérjék jellemzésével, mint pl. a *Thermococcales* hidrogenázok (ld. később).

Az élettani szereptől és lokalizációtól függetlenül a Ni-Fe hidrogenázok általában két alegységből, egy kb. 30 kDa-os kis, és egy kb. 60 kDa-os nagy alegységből állnak. A Ni-Fe hidrogenázok immunológiailag keresztreakálnak, ami hasonló építóp struktúrák jelenlétére, tehát szerkezeti rokonságra utal. Ez



hangsúlyozottabban igaz a nagy alegységre [21]. Mindazonáltal vannak 4 alegységes hidrogenázok, pl. az *A. eutrophus* egyik hidrogenáza, ezekben két alegység hasonlít a két alegységes hidrogenázok kis és nagy alegységéhez, a másik két alegység pedig valamilyen kiegészítő funkciót lát el, pl. az aerob *A. eutrophus* esetében a diaforáz aktivitásért felelős. Különleges kivételként egy alegységből áll bizonyos metanogének  $H_2$  termelő metil-tetrahidro-metanopterin redukáló hidrogenáza, amely teljesen különbözik a többi enzimtől abban is, hogy nem tartalmaz sem vas-kén kockákat, sem Ni-t. [48].

Mint az elnevezésből is kitűnik a Ni-Fe hidrogenázok tartalmaznak Ni-t és Fe-t, ez utóbbiak többségét ún. vas-kén kocka formájában. A hidrogenázok tipikusan egy Ni-t tartalmaznak, és egy [3Fe-4S] illetve egy vagy több [4Fe-4S] típusú vas-kén kockát [41]. A hidrogén aktiválást végző fém centrumokat ESR, ENDOR, EXAFS, illetve Mössbauer spektroszkópiával behatóan vizsgálták, és az enzim különböző oxidáltsági-aktiváltsági állapotaihoz rendelhető spektroszkópiai változásokat jellemezték. A különböző körülmények között felvett ESR spektrumokból az enzim három különböző, egymásba átalakítható állapotát lehetett regisztrálni, amivel párhuzamosan változott a Ni formális oxidáltsági foka [9]. A tényleges oxidációs állapotról máig is viták folynak, a modellekben Ni(I)H<sub>2</sub>, Ni(III)H<sub>2</sub>, vagy Ni(III)H<sup>-</sup> típusú átmeneti komplexeket feltételeznek.

Aktív állapot [Ni-C], melyben az enzim és a Ni is redukált állapotban van, de az aktuális Ni koordinációs állapot nem ismert. Készenléti állapot [Ni-B] egy átmeneti állapot az inaktív és az aktív állapot között. Ebből az aktivált enzimet viszonylag egyszerűen, hidrogénnel végzett redukcióval elő lehet állítani. A harmadik az ún. [Ni-A] inaktív stádium, amelyben a Ni(III) oxidációs állapotban van, az enzimnek nincs aktivitása. Ezek az állapotok többé-kevésbé reverzibilisen egymásba alakíthatók, habár a [Ni-A]  $\leftrightarrow$  [Ni-B] átmenet nem fordul elő [9]. Nyilvánvalóan az inaktív  $\Rightarrow$  aktív átalakulás lassabban, erősebb redukció hatására megy csak végbe, mint a B  $\Rightarrow$  C átmenet. A Ni redox állapotváltozásai és a hidrogenáz aktivitás közötti szoros összefüggésről kialakult, alapos és széleskörű ESR vizsgálatokra alapozott következtetéseket megkérdőjelezték az EXAFS mérések, amelyek rámutattak, hogy a Ni közvetlen környezetében semmilyen változás sem következik be az enzim különböző funkcionális állapotaiban [10]. A látszólagos ellentmondás megoldása a hidrogenáz kristályszerkezetének (ld. később) ismeretében adódik: a nagy feloldású atomi szerkezet mutatta meg, hogy a Ni-hez egy magányos Fe atom koordinálódik diszulfid hidakkal, a redox



változások tehát a két fématomot tartalmazó aktív centrumhoz és nem csak Ni atomhoz rendelhetők. A magányos Fe atom a molekulában levő sok - vas-kén kockák formájában jelenlevő - vas mellett a korábbi spektroszkópiai vizsgálatok során rejtve maradt. Az oxidációs-redukciós folyamatok természetesen érintik a vas-kén kockákban a Fe oxidációs állapotát is, ahol a kockák bruttó töltése 0, +1, +2 lehet [3].

Ni-Fe hidrogenázok gátolhatóak CO-val, acetilénnel és cianiddal, ezek a kétatomos molekulák többnyire a Ni-lel képeznek koordinációs kötést, és ezáltal gátolják az aktív centrum működését [3]. Érdemes megjegyezni, hogy az acetilén a csak Fe-t tartalmazó enzimek aktivitását nem szünteti meg, ami egy viszonylag egyszerű módszert kínál annak megállapítására, hogy csak-Fe, vagy Ni-Fe típusú hidrogenázt tartalmaz egy ismeretlen minta.

A hidrogenázok az élettani funkciónak megfelelően különböző elektron donorokat illetve akceptorokat használnak. Ilyen elektron átvivő molekulaként szerepelhetnek citokrómok, NAD, FAD vagy FMN [15, 26, 41].

Napjainkban egyre több hidrogenáz kódoló struktúrgén szekvencia lát napvilágot, és jelenleg már mintegy húszra tehető az ismert szekvenciák száma [15, 41].

A hidrogenázokat kódoló gének molekuláris biológiai nevezéktana sajnos meglehetősen zavaros. A gének és termékeik jelölésére különböző elnevezéseket használnak az irodalomban, pl. *hoxKG* az *A. eutrophus*, és *Azotobacter vinelandii*; *hupSL* a *R. capsulatus* és *T. roseopersicina*; vagy *hyaAB* az *E. coli* Ni-Fe hidrogenázának két alegységét kódoló géneket jelölik, amelyek egymás között számottevő szerkezeti hasonlóságot mutatnak a különböző laboratóriumokban kialakított, eltérő elnevezések ellenére [15].

A legtöbb hidrogenáz génje a kromoszómán található, de vannak olyan esetek is, amikor ezek a gének extrakromoszómális DNS-en, 180-510 kb méretű megaplazmidokon lokalizálódnak, pl. a *Nocardia opaca*-ban és az *Alcaligenes eutrophus*-ban [15, 40, 41].

Általában elmondható, hogy a kis és nagy alegységet kódoló gének egymással - bizonyos csoportosításokon belül (ld. fent) - homológok, és a kis alegységen belül 9 (jelölés: a-h), a nagy alegységen belül 12 (elnevezés: a-l) jól megőrzött szekvencia motívumot azonosítottak a Ni-Fe hidrogenázokban [46]. A jellegzetesen megőrzött szekvencia motívumok elsősorban a fém centrumok bekötődéséhez szolgáltatnak aminosav oldalláncokat, egyes szekvencia elemek szerepe még ismeretlen. Mivel a Ni-Fe hidrogenázok többségében megtalálhatók, feltételezik, hogy az enzim aktivitás kialakításában vagy az aktív szerkezet megőrzésében van fontos feladatuk.

Több kiegészítő enzim közreműködése mellett a hidrogenáz két alegysége is jelentős változásokon megy keresztül az aktív enzim bioszintézise során. Az érett, aktív enzim egy hosszabb prekuzorból képződik a nagy alegység C-terminális régiójának 15 - 20 aminosav hosszú peptidjének proteolitikus hasításával [18]. Bebizonyosodott a hidrogenáz érési folyamatának tanulmányozása kapcsán, hogy a Ni beépülés meg kell, hogy előzze a C-terminális hasítást, a peptidet nem tartalmazó hidrogenáz nagy alegységébe a Ni már nem kötődik be [6]. A periplazmában vagy membránhoz kötött hidrogenázoknak a membránon keresztül történő átjutását egy ún. szignál szekvencia teszi lehetővé, amelyet a megfelelő sejtalkotó elérése után egy proteáz specifikusan lehasít. [41]. Ezek a szignál szekvenciák szokatlanul hosszúak, és tartalmaznak egy erősen konzervált "RRXFXK" motívumot, valamint az ismert membránhoz kötött hidrogenázok 80 %-ában a hasítás alanin után megy végbe.

## II/2. Hidrogenáz gének szerveződése, segédgének, szabályozás

A hidrogenázokat kódoló struktúrgének kivétel nélkül úgy rendeződnek el, hogy a kis alegységhez képest a nagy alegység 3' irányban helyezkedik el [15, 41]. Ezek általában egy transzkripció egységet képeznek és szinte minden esetben közvetlenül egymás után következnek. Újabban néhány olyan genetikai elrendeződést fedeztek fel, ahol a struktúrgénekben belül egy extra DNS fragment ékelődik be. *E. coli*-ban a 2. hidrogenázt kódoló *hybABC*-ben a *hybC* a hidrogenázok nagy alegységével mutat hasonlóságot, viszont a *hybB* nem hasonlít a kis alegységre, hanem egy citokróm b típusú fehérjét kódol [29]. Habár a szerzők a *hybA*-t javasolták a kis alegységet kódoló génnek, azóta kiderült, hogy a *hybA*-tól 5' irányban található első nyitott leolvasási keret mutat meggyőző hasonlóságot a



hidrogenázok kis alegységével [34]. Mások olyan közbeékelődött szekvenciát találtak, amely a cianobaktérium *Anabeana* heterociszta differenciálódásban játszik szerepet [11]. A *T. roseopersicina*-ban is találtunk egy kb. 2 kb-os közbeékelődött szekvenciát a kis és nagy alegység között, aminek szerepe egyelőre még nem tisztázott [34].

A kiegészítő hidrogenáz gének szerveződésére jellemző, hogy egy csoportban található a struktúrgénektől 5' illetve 3' irányban. A jellegzetes hidrogenáz géncsalád egyes termékeinek funkciója csak részben ismert.

A fém-centrumok kialakítása számos fehérje közreműködésével történik. Tehát az aktív hidrogenáz enzim képződéséhez egyidejűleg több gén termékére is szükség van, ezek közül a polipeptid láncok végső hosszát meghatározó különleges peptidázokról fentebb már említést tettünk. A fématomok felvételében, szállításában, tárolásában és beépítésében több fehérje vesz részt, amelyek természetét és szerepét mostanában kezdjük feltérképezni. Ismert pl., hogy a Ni beépülése aktív folyamat és speciális enzimek szükségesek hozzá. Ilyen enzimet azonosítottak pl. az *A. eutrophus*-ban a *hoxN* gén termékéként. A HoxN fehérje a sejt Ni felvételében játszik szerepet [45]. Hasonló szerepet játszanak a *B. japonicum*-ban a HupNOP fehérjék, amelyek a Ni felvétel mellett annak a hidrogenázba történő beépítéséért is felelősek [16]. A fémek kezelése mellett a hidrogenáz bioszintézisének szabályozában olyan fehérjék is közreműködnek, amelyek a külvilág jeleit érzékelik [15, 41, 42].

A hidrogenázok expresszióját - az enzim fiziológiai szerepétől függően - különböző faktorok szabályozzák. Általában a H<sub>2</sub> pozitív szabályozó szerepet játszik, azaz nem csak a fehérje aktív szerkezetének kialakításához szükséges a redukzív atmoszféra, de a hidrogén transzkripció szinten is kifejti hatását (pl. *hupUV* [42]). Ellenkező, represszáló hatása van/lehet az oxigénnek, és több mikroorganizmusban bizonyították, hogy a hidrogenáz gén expresszióját a Ni transzkripció szinten szabályozza [41]. Azokban a mikroorganizmusokban ahol a hidrogenáznak a nitrogén fixálás során felszabaduló H<sub>2</sub> újrahasznosítása a feladata, a hidrogenáz gén expressziója nitrogén szabályozás alá eshet, és szorosan kapcsolódik a nitrogénáz expressziós szintjéhez [12, 34]. Ilyenkor a transzkripcióhoz  $\sigma^{54}$  faktorra, illetve az *rpoN* gén közreműködésére van szükség, és az 5' végi régió sok esetben tartalmaz IHF ("integration host factor") kötő

helyet [12, 15, 41]. Deléciós mutánsok analízise további faktorok felfedezéséhez vezetett, mint pl. az *A. eutrophus* esetén az aktivátor *hoxA* vagy a mellette elhelyezkedő *hoxX*, ami feltevések szerint hisztidin kinázt kódol, és a jel továbbításban van szerepe [15]. Ezek részletes áttekintésére nem vállalkozunk, hanem kítűnő átfogó munkákra hivatkozunk [15, 41]. Néhány esetben nem sikerült a hidrogenáz expresszióját befolyásoló faktorokat kimutatni, és az enzim promotere konstitutívnak tekinthető. Ez a helyzet pl. a *T. roseopersicina* stabil hidrogenáza esetén [23].

### II/3. Kristályszerkezet

Máig az egyetlen Ni-Fe hidrogenáz, amelynek a kristályszerkezetét meghatározták a *Desulfovibrio gigas* periplazmában található hidrogenáza [43]. Ez az enzim egy Ni-t, egy [3Fe-4S] és két [4Fe-4S] kockát tartalmaz. Habár a felállított modell tartalmaz még néhány bizonytalan elemet, a szerzők a következő megállapításokat tették:

- az összes vas-kén kockát a kis alegység köti, míg a Ni a nagy alegységhez kapcsolódik.
- az aktív centrum a Ni és közvetlen környezete, amihez képest van egy közeli és egy távoli [4Fe-4S] kocka, illetve a kettő között található a [3Fe-4S] kocka.
- a távoli [4Fe-4S]-t a His185S, Cys219S, a közeli [4Fe-4S]-t a Cys148S, Cys 17S, a [3Fe-4S]-t a Cys246S és a Cys249S koordinálja, míg a Ni-hez a Cys65L, Cys68L, Cys 530L, és a Cys533L kapcsolódik (az S és L betűk a kis és nagy alegységet jelentik).
- a Ni környezetében van egy másik fématom is, ez a magányos vasatom két diszulfid hídon keresztül és egy O<sub>2</sub> vagy CO hídon keresztül kerül koordinációs kötésbe a Ni-lel. Érdekes módon újabban Mg jelenlétére utaló eredményeket is kaptak, ami esetleg a nagy alegység C terminális proteolitikus hasításánál lehet szükséges.
- a töltés mozgás a  
 {szubsztrát ↔ [4Fe-4S]<sub>táv.</sub> ↔ [3Fe-4S] ↔ [4Fe-4S]<sub>köz.</sub> ↔ [Ni] ↔ szubsztrát}  
 útvonalon halad. Ezt alátámasztja az, hogy a közeli [4Fe-4S] kockának a féllépcső potenciálja meglehetősen közel van az aktív centrumban lévő Ni féllépcső potenciáljához.



A modell még biztosan finomításra szorul, és vannak adatok, amelyek nincsenek teljes összhangban ezzel a képpel [5], de mindenképpen jelentős lépés a hidrogenázok működésének megértéséhez.

#### II/4. Hidrogenáz(ok) a *Thiocapsa roseopersicina*-ban

*Thiocapsa roseopersicina* a *Chromatiaceae* családhoz tartozó bíbor, kénfüggő fotoszintetizáló baktérium. 14 °C-os tengervízből izolálták, laboratóriumban 30 °C körül nő optimálisan. Fakultatív anaerob, és képes megfelelő körülmények között N<sub>2</sub>-t fixálni. Régóta ismert, hogy tartalmaz egy Ni-Fe hidrogenázt [17], amely mind a két - hidrogén fejlesztés és fogyasztás - irányban képes működni, és a többi Ni-Fe hidrogenázhoz képest szokatlan tulajdonságokkal rendelkezik. A natív enzim meglehetősen stabil proteolitikus emésztéssel szemben és nem volt hasítható termolizinnel, tripszinnel, proteináz K-val stb. Ez a tulajdonsága előnyös a fehérje tisztítás szempontjából [21]. Másik rendkívül érdekes sajátossága, hogy habár a *T. roseopersicina* mezofil mikroorganizmus, a hidrogenáza hőtűrő, a legelső adatok szerint 70 °C az enzim működés optimális hőmérséklete [17]. A hidrogenáz kevésbé érzékeny O<sub>2</sub> inaktíválásra, és levegőn 60 °C-on tartva 3 percig az összaktivitás 80 %-a megmarad [23]. Az enzim fenti speciális tulajdonságai miatt került a kutatócsoportunk figyelmének középpontjába. Az enzimet biokémiaileg részletesen jellemezték, és megállapították, hogy két alegységből (egy 64 kDa-os nagy és egy 34 kDa-os kis alegységből) áll, a natív enzim molekulásúlya 90 - 100 kDa [23]. Hidrogenáz aktivitásra festett natív poliakrilamid gélen két különböző aktivitást tudtak detektálni, amiket a hidrogenáz két különböző, aktív konformációjának feleltettek meg. Az egyik sáv nagy specifikus aktivitású, O<sub>2</sub> érzékeny, ezt a [Ni-C] állapothoz (ld. fent) rendelték, míg a másik O<sub>2</sub>-re kevésbé érzékeny, viszont a specifikus aktivitása is sokkal kisebb. Ez utóbbi a [Ni-B] állapottal hozható kapcsolatba [23]. Egy, a csoportban kifejlesztett technika segítségével (proton induced X-ray emission spectroscopy, PIXE és poliakrilamid gélelektroforézis kombinációja) meghatározták a fémtartalmat, eszerint minden fehérje dimer 1 Ni-t és 7±1 Fe-t tartalmaz [5]. A hét Fe feltehetően egy [4Fe-4S] és egy [3Fe-4S] kockába szerveződik. Különböző spektroszkópai módszerekkel az enzimet behatóan tanulmányozták pl. [10]. Ezek a részletes ismertetésétől itt eltekintünk.

A *T. roseopersicina* tisztított hidrogenáza membrán kötött, a baktérium sejteket az enzim  $H_2$  aktiválásra ugyanolyan irányú membrán potenciált generál, mint ami a fotoszintézis során keletkezik [22], ami arra utal, hogy a fotoszintetizáló membrán bioenergetikai folyamataiban játszik szerepet.

Arra irányuló kísérletek, hogy a stabil hidrogenázt kódoló géneket izolálják, vezettek egy másik géncsalád felfedezéséhez [12], amit *hupSL*-nek neveztek el. A *hup* géncsalád nagymértékben homológ más Ni-Fe hidrogenázok génjeivel, és tartalmazza az összes olyan szekvenciaelemet és tulajdonságot, amely alapján a hidrogenázokat azonosítani lehet. Feltételezhető tehát, hogy ez is egy hidrogenázt kódol, de a lefordított aminosav szekvencia nem egyezik meg a stabil hidrogenáz alegységeinek N-terminális aminosav sorrendjével. A *hupSL* struktúrgéneken kívül a segéd gének szerveződése, és szekvenciája is nagy hasonlóságot mutat a *R. capsulatus* megfelelő génjeivel. A gének promotere úgy tűnik, nitrogén szabályozás alatt áll, és tartalmazza a -12/-24 konszenzus elemeket, valamint 5' irányban egy IHF kötő helyet [12].

Mostanában sikerült kimutatni nitrogén fixáló körülmények között nevelt sejtekből ioncserélő kromatográfiával egy indukálható hidrogenáz aktivitást, amely a hidrogenáz1-től eltérő fehérjének tulajdonítható. Erre utal, hogy ez az aktivitás eléggé instabil, illetve az a tény, hogy a nem nitrogén fixáló körülmények között nevelt sejtekben ilyen aktivitást nem találtunk. Ez az indukálhatóság összhangban van a *hupSL* gének promoterének sajátosságaival. Ugyanakkor az ismert, konstitutív hidrogenáz1 aktivitás nitrogén fixáló és nitrogénáz represszált sejtekben egyformán mérhető [34].

## II/5. Hipertermofil mikroorganizmusok és hidrogenázaik

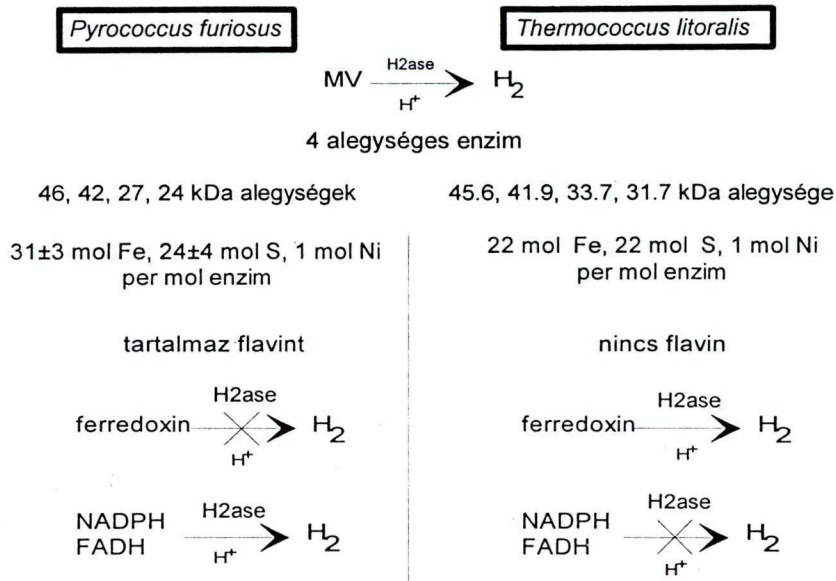
Hipertermofil mikroorganizmusok olyan baktériumok és archaeabaktériumok, amelyek  $80\text{ }^\circ\text{C}$  felett nőnek, de  $60\text{ }^\circ\text{C}$  alatt nem képesek szaporodni. Túlnyomó többségük archeon, de néhány baktérium, mint a *Thermatoga maritima* vagy *Aquifex pyrophilus* is előfordul a hipertermofilok között [7, 39]. A legkülönbözőbb helyekről lehet ilyen sejteket izolálni, pl. mélytengeri hőforrásokból, vulkánok környékéről, gejzírekből vagy akár kéményekről. A hipertermofil mikroorganizmusok egyre inkább a tudományos érdeklődés középpontjába kerülnek. Az ilyen sejtekben működő enzimek kivétel nélkül termostabilak, ami a biotechnológiai felhasználás terén előnyös lehet.



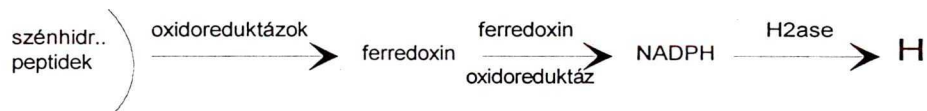
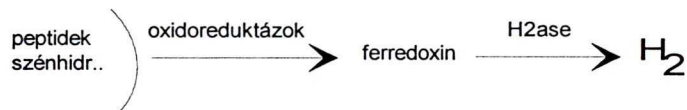
Másrészt ezeket a mikroorganizmusokat tekintik a jelenleg ismert legősibb élőlényeknek [7, 39]. Mind aerob, mind anaerob körülmények között növekvő törzsek előfordulnak, és a növekedéshez szükséges optimális pH is széles tartományban változhat (pH = 1.0 - 9.0). A hipertermofil kemolitotróf mikroorganizmusok energiaátalakító anyagcsere folyamataiban a hidrogénnek jelentős szerepe van. CO<sub>2</sub> redukciójából energiát képesek nyerni pl. a metanogének, mások pedig szulfid, szulfát, nitrát, oxigén stb. redukciójából. Mindazonáltal csak néhány hidrogenázt jellemeztek ezekből a mikroorganizmusokból. Csak Fe-t tartalmazó hidrogenázt mutattak ki *T. maritimában* [19], speciális egy alegységes hidrogenázt a metanogén *M. thermoautotrophicumban* [48], és 4 alegységes Ni-Fe hidrogenázokat a *Thermococcales* fajhoz tartozó sejtekben: *Pyrococcus furiosus*-ban [8], *Thermococcus litoralis*-ban (Zhou nem publikált eredmény) és *Thermococcus stetteri*-ben [49]. Az egyetlen hipertermofil archaeon Ni-Fe hidrogenázt kódoló géncsalád, amelynek a szekvenciáját meghatározták, a *P. furiosus* hidrogenáz [32].

A *Thermococcales* családba tartozó a *P. furiosus* és *T. litoralis* heterotróf anyagcserét folytat, a *P. furiosus* optimális hőmérséklete 95 °C, és inkább a szénhidrátokat, míg a 86 °C-os hőmérsékletet kedvelő *T. litoralis* a peptideket részesíti előnyben a növekedéséhez. A két törzs mindazonáltal nagy hasonlóságot mutat [30]. Mind a kettő tartalmaz egy-egy négyalegységes, citoplazmatikus Ni-Fe hidrogenázt, amelyek funkciója a szénhidrátok, peptidek fermentációja során felszabaduló elektronok H<sub>2</sub> vagy H<sub>2</sub>S formában való eltávolítása a közeg kéntartalmától függően [2]. Eleinte azt hitték, hogy mindkét rokon hipertermofil archaeon csak kén jelenlétében tud nőni, ez azonban nem teljesen igaz, bár a kén serkenti a növekedést. Kén jelenlétében viszont ezek a hidrogenázok nem hidrogént, hanem kénhidrogént fejlesztenek, s ennek megfelelően a hidrogenáz szulfhidrogenázként funkcionál [24]. Ezeknek az enzimeknek jelentős a H<sub>2</sub> termelő aktivitása, ami nem jellemző a mezofil [NiFe] hidrogenázokra és nagy jelentőségű lehet a biotechnológiai energiatermelés és raktározás területén [46]. A fenti enzimek biokémiai jellemzése a hasonlóságokon túl alapvető különbségekre is rávilágított. Az 1A. ábrán mutatjuk be a két hidrogenáz közös illetve eltérő sajátosságait.

A.



B.

*Pyrococcus furiosus**Thermococcus litoralis*

**1. ábra** A.; A *P. furiosus* és *T. litoralis* hidrogenázainak összehasonlítása  
 B.; A H<sub>2</sub> fejlesztéshez vezető javasolt fermentációs útvonal a két hidrogenáz esetén. *P. furiosus* [8, 26], *T. litoralis* (Zhou személyes közlés)

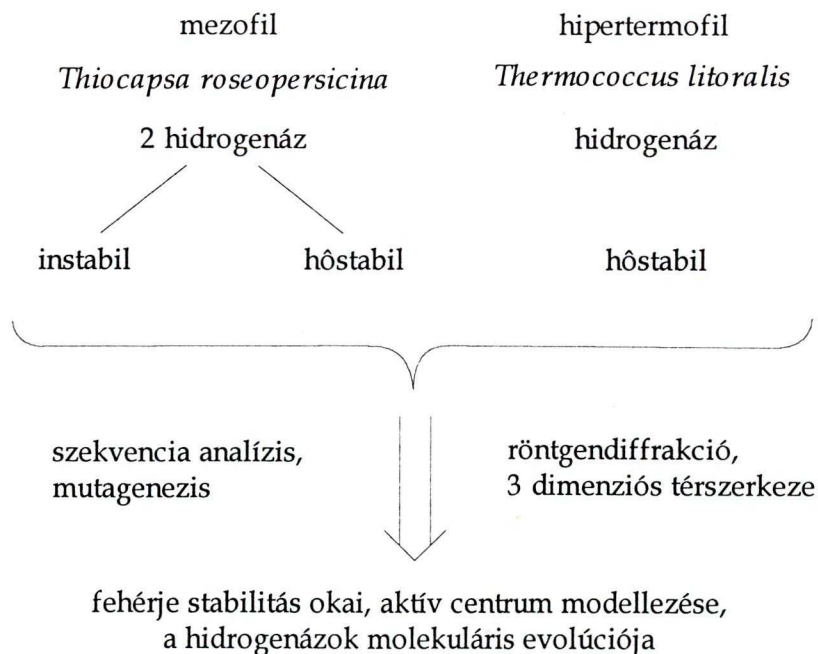
Úgy tűnik, hogy a két enzim különböző szubsztrátot használ elektrondonorként, és ennek megfelelően a H<sub>2</sub> fejlesztéshez vezető út némileg rövidebb a *T. litoralis* esetén (1B. ábra). A *P. furiosus* hidrogenázt kódoló gének



szekvencia meghatározása során kiderült, hogy a gének  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\alpha$ , sorrendben követik egymást, ahol a  $\delta$ ,  $\alpha$  alegységek a mezofil hidrogenázok kis és nagy alegységének felelnek meg, míg a  $\beta$ ,  $\gamma$  alegységek a *Salmonella typhimurium* szulfid redukázával mutatnak hasonlóságot [32]. A szerzők a  $\gamma$  alegységen belül találtak egy feltételezhetően nukleotid kötő régiót, ami összhangban van a biokémiai adatokkal, mely szerint a *P. furiosus* hidrogenázának szubsztrátja a NADPH [26]. Azonosítottak *P. furiosus*-ban egy másik enzimet, amely heterodimerként képes poliszulfidot kénhidrogénné redukálni NADPH, mint elektrondonor jelenlétében [25]. Ezt az enzimet szulfid dehidrogenáznak nevezték el, és egyelőre még nem tisztázott, hogy mi a viszonya a hasonló élettani feladatok ellátásában a fenti hidrogenázzal.

### III. CÉLKITŰZÉS

A *Thiocapsa roseopersicina* stabil hidrogenáz hőtűrő képességének molekuláris szinten történő értelmezése alapkutatási probléma, amelynek eredményei a fehérje tervezésben, stabil biológiai katalizátorok kifejlesztésében hasznosíthatók. A megoldási stratégiánkat a 2. ábrán foglaltam össze. A továbbiakban a stabil *T. roseopersicina* hidrogenázra hidrogenáz1-ként hivatkozunk; a két alegységből álló, konstitutív hidrogenáz1 fehérjét kódoló géneknek *hydS* (kis alegység) és *hydL* (nagy alegység) elnevezést adunk. Mint az irodalmi bevezetésből kiderül, a hidrogenáz1-t kódoló gének azonosítására irányuló kísérletek vezettek egy olyan géncsalád azonosításához, ami minden bizonnyal szintén hidrogenázt kódol, de nem azonos a hidrogenáz1-el [12]. Ennek a hidrogenáznak a struktúrgénjeit *hupSL*-lel jelöljük a következőkben. Nitrogén fixáló körülmények tenyésztett baktérium kultúrákban kimutattunk egy második hidrogenáz aktivitását. Az enzim aktivitás a hidrogenáz1-től eltérően instablnak és indukálhatónak bizonyult, ezért instabil hidrogenáz, vagy hidrogenáz2 nevet kapott [34].



**2. ábra.** A csoport átfogó stratégiája.

A fenti stratégia megvalósításához a következő célokat tűztük ki:

1. Izolálni és jellemezni a *T. roseopersicina* hidrogenáz1-t kódoló géneket
2. Izolálni és jellemezni a *T. litoralis* citoplazmatikus hidrogenázát kódoló géneket.
3. Genetikai rendszert kidolgozni a *T. roseopersicina*-ra, hogy mutagenézis kísérleteket lehessen elvégezni.
4. Genetikai rendszert kifejleszteni a hipertermofil mikroorganizumokra, és ehhez
5. Olyan lemezelési technika kidolgozása, amely segítségével izolált hipertermofil kolóniákat lehet nyerni.
6. Bebizonyítani, hogy a *T. roseopersicina* *hupSL* gének a hidrogenáz2-t kódolják.
7. Kristályosítani az enzimeket, és meghatározni a háromdimenziós térszerkezetüket.

A fenti célkitűzések a csoport terveit tükrözik. Ezen belül a dolgozat az 1. 2. és 5. pontban leírt feladatok kapcsán elért eredményekkel foglalkozik.

## IV. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

**Növesztési körülmények.** *T. roseopersicina* BBS sejt vonalat Prof. E.N Kondratieva-tól kaptuk, és 28-30 °C-on, folyamatos megvilágítás mellett növesztettük Pfennig közegben 0.1% NH<sub>4</sub>Cl jelenlétében vagy anélkül [34]. *T. litoralis* sejtek Prof. Mike Adams laborjából származtak, és általában 86 °C-on anaerob körülmények között növesztettük 1-2 napig a sejtek számára optimális közegben [35].

**Aminosav szekvencia meghatározás** *T. roseopersicina* stabil hidrogenázát már publikált protokoll szerint tisztítottuk [23], majd aktivitás festett SDS-PAA gélből kivágtuk az aktív sávot, eluáltuk 20 mM nátrium-foszfát pufferben (pH=7.0). A nagy és kis alegységet ezután denaturáló poliakrilamid gélen választottuk el, majd Problott (Applied Biosystems) membránra blottoltuk. Az amino terminális szekvenciát ezt követően meghatároztattuk. A belső szekvenciák esetén hasonlóan jártunk el, de előtte aszpartát endopeptidázzal megemésztettük (Boehringer, szekvenáló minőség) a megfelelő alegységeket.

A *T. litoralis* hidrogenáz amino terminális szekvenciáit Prof. Mike Adams laboratóriumában határozták meg [Zhou nem publikált eredmény].

**Kromoszómális DNS tisztítás, könyvtárak készítése.** *T. roseopersicina* kromoszómális DNS-t [12] szerint tisztítottunk, és a pHc79 kozmidban való genomi könyvtárak készítése ugyanitt található meg. A *T. litoralis* sejtekből [36] szerint tisztítottunk kromoszómális DNS-t és λZAP EXPRESS/*EcoRI* (Stratagene) fág-könyvtárat készítettünk a cég útmutatásai alapján. A hibridizáció után pozitív jelet adó fágokból szintén a gyártó instrukciói alapján nyertük ki az *EcoRI* fragmenteket tartalmazó pBK CMV fagemideket.

**DNS manipulációk.** A DNS manipulációkat az általánosan elfogadott [37] alapján végeztük, a plazmid tisztítás során sok esetben a Qiagen termékeit, illetve saját fejlesztésű protokollt használtunk (ez utóbbit egyelőre üzleti-titkossági okok miatt nem hoztuk nyilvánosságra). A restriktív illetve DNS manipulációs enzimek



Boehringer Mannheim GmbH, Fermentas, Stratagene, Pharmacia, USB/Amersham cégek termékei voltak.

**PCR.** A polimeráz lánc reakciót a közismert leírások szerint hajtottuk végre [37], általában 50-56 °C hibridizációs hőmérsékletet használva. Kromoszomális DNS-en nagy degeneráltsági fokú primerekkel az első néhány ciklust alacsony (37 °C) hőmérsékleten végeztük. A polimerizáció során az 1 perc/ 1 kilobázis szabályhoz igazodtunk 72 °C-on hajtva végre a reakciót.

**Hibridizáció.** Kolónia, plakk Southern- hibridizáció során a Boehringer Mannheim GmbH "Genius" nem-radioaktív készítményét használtuk, és a hibridizációt a cég útmutatásai alapján végeztük digixigenin jelölt DNS próbával. A próba jelölésére minden esetben a taláalomra hibridizáló primer módszert használtuk ("random priming").

**DNS szekvenciaanalízis.** A DNS nukleotid sorrendjének meghatározásához az USB/Amersham Sequenase Version 2.0 rendszert használtunk az esetek túlnyomó többségében. Néha az Applied Biosystems 373 vagy 373A típusú automata DNS szekvencia analizátoraihoz folyamodtunk.

**RNS tisztítás, Northern blot- és hibridizáció.** Total RNS tisztításra a Gibco BRL által forgalmazott Trizol reagenst használtuk. Northern blot és hibridizációs kísérleteket többfajta módszer alapján végeztünk. Ezek közé tartozik az Ambion által forgalmazott NorthernMax kit, néhány esetben [4] útmutatásait követtük, illetve a hibridizáció során felhasználtuk a Boehringer Genius kit Northern hibridizálásra optimalizált körülményeit [14].

**Primer extenzió.** Primer extenziós kísérleteket *T. litoralis* totál RNS-en végeztünk [4] alapján. Egy esetben eltértünk az előírt protokoltól és <sup>32</sup>P végjelölés helyett <sup>35</sup>S beépítéses jelölést használtunk (35μCi α<sup>35</sup>SdATP) a protokoll többi részének elvi betartása mellett. Az izotópokat az Amersham-tól, vagy a Magyar Izotóp Intézettől vásároltuk. Primer extenzióhoz AMV vagy MMuLV reverz transzkriptázt használtunk.

**Fehérje túltermeltetés.** A *T. litoralis* alegységeinek *E. coli*-ban való túltermeltetéséhez a Novogen "pET" túltermeltető vektorait használtuk a cég előírásai alapján BL21 sejtek különböző változataiban.

**Számítógépes programok.** A DNS és fehérje szekvenciák számítógépes analízisét egyrészt a DNASIS, másrészt a Blast, Clustalw, GCG programcsomag Clustalw, Prettyplot, Prettybox programjaival végeztük.

## V. 1. T É Z I S P O N T

### **A *T. roseopersicina* stabil hidrogenázát kódoló gének izolálása és jellemzése**

#### V/1. *A gének izolálása*

Mivel *R. capsulatus*-ból származó heterológ próbával a stabil hidrogenáz kódoló gének helyett egy másik hidrogenázhoz tartozó *hupSL* géncsaládot sikerült izolálni, a hidrogenázl gének azonosításához más stratégiát kellett választani. Meghatároztuk a stabil hidrogenáz kis és nagy alegységének amino-terminális szekvenciáit, és ezek alapján degenerált primereket terveztünk, hogy PCR segítségével felszaporíthassuk a gének egyes darabjait (3. ábra). Ehhez feltételeztük, hogy esetünkben is érvényes az az általános megfigyelés, hogy a kis alegység megelőzi a nagy alegységet, és ezek közvetlenül egymás után következnek a genomban [15, 41]. A várt, kb. 0,8 - 1 kb-os PCR termék gyakorlatilag a teljes kis alegységet kódoló gén lett volna. Sajnos tucatnyi primer tervezése és felhasználása sem vezetett eredményre. Bár sok esetben kaptunk a várt mérettartományba eső PCR termékeket, ezek szekvenciái nem feleltek meg a várakozásnak. Felülvizsgálva feltevésünket az alegységek genomialis szerveződéséről, arra a következtetésre jutottunk, hogy hatékonyabb megközelítés lehet, ha intergenikus régiók helyett intragenikus szakaszokat próbálunk célba venni. Ehhez a tisztított kis és nagy alegység polipeptideket aszpartát endopeptidázzal emésztettük és mindkét alegységből egy-egy peptid N-terminális aminosav sorrendjét meghatároztuk (3. ábra). Ezekre degenerált DNS primereket tervezve és felhasználva a teljes alegységek N-terminális régióra tervezett primereket sikerült előállítani a 3. ábrán látható 0,8 kb-os ACRG4 fragmentet a nagy alegységre, illetve egy 0,3 kb-os szakaszt (TSUP2-t) a kis alegységre. A nagy alegység esetében még így is csak úgy egyértelmű eredményt, ha az ACX12-ACX14 primer párral előállított PCR termékeken egy második PCR-t hajtottunk

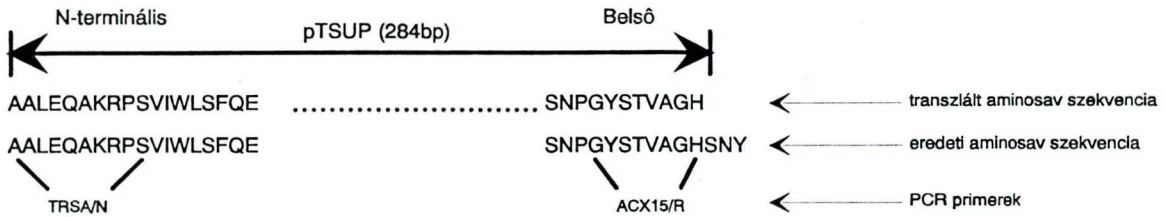


vége az ACX12-ACX13 primer párral. A PCR termékeket klónoztuk (pACRG4, pTSUP2) és meghatároztuk DNS szekvenciájukat. Az aminosavra fordított szekvencia teljesen megegyezett a fehérje szekvenálás eredményével, így elmondhatjuk, hogy sikerült homológ próbákat előállítani hidrogenáz1 génjeire.

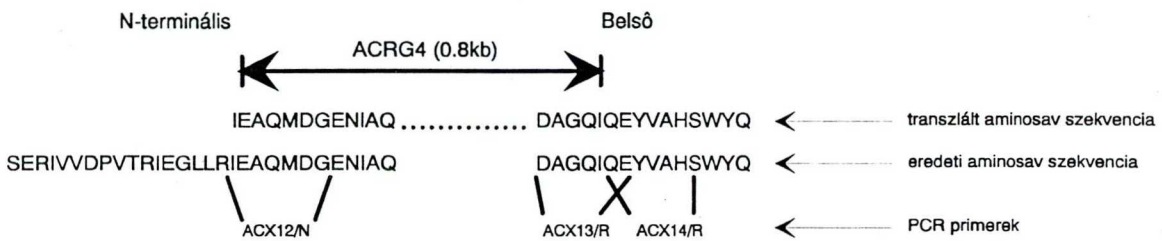
Digoxigeninnel jelölt ACRG4 fragmentet használtuk a *T. roseopersicina* kromoszomális DNS-ből készült kozmid könyvtárak (*Bam*HI, és *Pst*I enzimekkel parciálisan emésztett *T. roseopersicina* genomi DNS, pH79 kozmid megfelelő hasítóhelyén [12]) kolónia hibridizációjára. Mind a két könyvtárból egy-egy pozitív klónt kiválasztottunk, amelyek mérete becslés szerint mintegy 40 kb. Ezen klónok *Bam*HI-gyel és *Pst*I-gyel történt teljes emésztése után egy 4,5 kb-os *Pst*I, két 5 kb-os *Bam*HI fragmentet - melyek Southern hibridizációban pozitívnak bizonyultak - klónoztunk pBluescribe19+ vektor megfelelő helyére (pTSH4/5, pTSH2/8, pAK41 egyenként). Mint a 4. ábrán látható ezek átfedő klónok, és mintegy 11 kb-os régiót fednek le. A három, nagyobb fragmentet tartalmazó klónokat szubklónoztuk a 4. ábrán feltüntetett enzimek segítségével és a nukleotid sorrendjüket meghatároztuk. A nem átfedő kónok illeszkedési pontjait alkalmasan tervezett speciális oligonukleotid primerekkel végzett szekvenálásokkal ellenőriztük.



## KIS ALEGYSÉG



## NAGY ALEGYSÉG



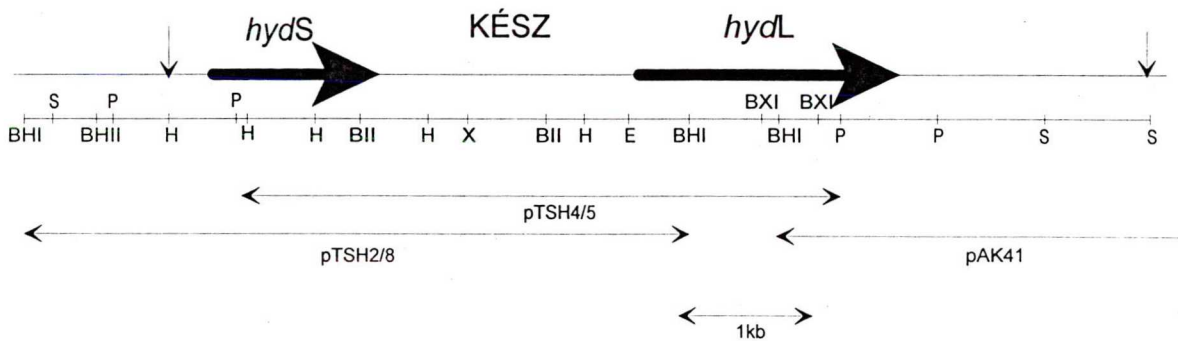
**3. ábra** A peptid szekvenálásból kapott aminosav sorrendek összehasonlítása a genomi DNS-ből amplifikált DNS szakaszok szekvenciáiból lefordított aminosav sorrendekkel.

Egy kb. 7 kb-os régió szekvenciáját határoztuk meg mind a két irányból, amely tartalmazza a teljes kis és nagy alegységet valamint mintegy 2 kb-os régiót a struktúrgénektől 3' irányban [34]. A szekvenciát terjedelmi okok miatt nem közöljük. További 1 kb. szakasz (5' irányban) szekvencia analízise is - legalábbis az egyik szálon - készen van. A 4. ábrán rögtön feltűnik, hogy a hidrogenáz1 nemcsak a fehérje természetét illetően rendelkezik különleges tulajdonságokkal, hanem a gén szerveződése is speciális. Nevezetesen a kis és nagy alegység között egy 2 kb-nyi közbeékelődött szekvencia (KÉSZ) van, ami meglehetősen ritka a Ni-Fe hidrogenázok körében. Ez megmagyarázza azt is, hogy csak az alegységek N-terminális szekvenciái alapján miért nem sikerült homológ próbát előállítani.

## V/2. A *hydS* és *hydL* jellemzése

A *hydS* egy olyan nyitott leolvasási kerettel kezdődik, amely tartalmaz egy 47 aminosav hosszúságú szignál szekvenciát:

MAARNPTDKTLGESLRERGVSRRRGFLKFCAATASMMALPP SMAPAIA,  
a membránkötött hidrogenázokra jellemző motívummal együtt (aláhúzva, és vastagítva), illetve a hasítás várt helyénél az Ala-t. Ez a korábbi adatokkal egyezésben meggyőző érv amellet, hogy a hidrogenáz is membránkötött fehérje.



**4. ábra** A *T. roseopersicina* stabil hidrogenázát kódoló lókuszt restrikciós térképe. *hydS* a kis, *hydL* a nagy alegységet, míg KÉSZ: a közbeékelődött szekvenciát jelöli. A függőleges nyilak a 100 %-ban kész szekvencia határait jelzik [34]  
BHI: *Bam*HI, BII: *Bgl*II, BHII: *Bss*HII, BXI: *Bst*XI,  
E: *Eco*RI, H: *Hinc*II, P: *Pst*I, S: *Sph*I.

A szignál peptid nélkül a *hydS* egy 323 aminosav hosszú, 34062 Da molekulatömegű polipeptidet kódol, ami jó egyezésben van a SDS-PAGE-ből nyert adatokkal (34 kDa).

A *hydL* által kódolt fehérjének is két formája van. Mint korábban láttuk, a nagy alegység is rövidül a translációt követően a C-terminális végen egy kb. 15 aminosav hosszú oligopeptid proteolitikus lehasításával. A *hydL* is tartalmazza azt a konzervált hisztidint, amelynél a hasítás elő szokott fordulni (5. ábra), habár a



következő aminosav valin helyett [18] leucin. Az éretlen fehérje 577 aminosavból áll, amiből egy 15 aminosav hosszú peptid vágódik le, s így képződik a 62204 Da molekulatömegű érett nagy alegység, ami jó egyezésben van a fehérje molekulatömeg-meghatározás 64 kDa-os értékével [23].

### KIS ALEGYSÉG

brajaS	P V I W M H G L E C T C C S E S	69	G H G C I G C S E D G F W D	305
azviS	P V L W L H G L E C T C C S E S	68	G H G C I G C S E D G F W D	304
trhupS	P V V W L H G L E C T C C S E S	68	G H G C I G C S E D G F W D	304
trhydS	S V I W L S F O E C T G C T E S	72	G H P C L G C S E P R F W D	309
dsvuS	S V V Y L H N A E C T G C S E S	73	G H P C I G C S E P D F W D	309

blokk B

blokk E

### NAGY ALEGYSÉG

trhupL	L V V D P V T R I E G H L R	31	P L E I L R T L H S F D P C L A C A T H	581
brajaL	I V V D P V T R I E G H M R	31	P L E I L R T I H S F D P C L A C S T H	581
azviL	I V V D P V T R I E G H M R	30	P V E I L R T L H S F D P C L A C S T H	587
trhydL	I V V D P V T R I E G H L R	18	P I E I L R T I H S F D P C I A C A V H	561
dsvuL	I V V D P V T R I E G H L R	38	P V E I L R T V H S F D P C I A C G V H	552

blokk A

blokk F

5. ábra Többszörös fehérje hasonlósági teszt néhány hidrogenáz kis és nagy alegységére. A konzervált blokkok elnevezését illetően ld. [47]  
 braja: *B. japonicum* [38], azvi: *A. vinelandii* [28], dsvu: *D. vulgaris* [13],  
 trhup: *T. roseopersicina hup* [12], trhyd: *T. roseopersicina hyd* génjei

A *hydSL* és *hupSL* gének fehérje termékei tartalmazzák az összes olyan konzervált szekvencia motívumot, ami a membránkötött Ni-Fe hidrogenázokat jellemzik [47]. Néhány ilyen fehérje szekvenciablokk egymáshoz való illesztése látható az 5. ábrán két-két szekvencia motívum esetén. A szekvenciák konzerváltsága meggyőző, és aligha kétséges, hogy mind a *hupSL*, mind a *hydSL* kétalegységes hidrogenáz kódoló gének. Habár más típusú prokariótákban ismert jelenség, hogy egy sejten belül több hidrogenáz fordul elő, (pl. *E. coli*, ahol

legalább három, de újabban egy negyedik hidrogenázt is leírtak)[15, 41], a fotoszintetikus baktériumok körében ez az első eset, hogy mind biokémiai mind genetikai eszközökkel két hidrogenáz jelenlétét bizonyítottuk be egy mikroorganizmuson belül.

### V/3 . Közbeékelődött szekvencia (KÉSZ)

Nem ismeretlen, de igen ritka jelenség, hogy a kis és nagy alegység nem közvetlenül egymás után következik a kromoszómán, hanem valamilyen egyéb szekvencia beékelődik. Ilyen fordult elő pl. az *E. coli* hidrogenáz2 esetében [29], ahol a nagy alegység génjét (*hybC*) nem a kis alegység előzi meg, hanem egy transzmembrán doméneket tartalmazó citokróm b típusú fehérjét kódoló gén (*hybB*). Bár a szerzők az ezt megelőző nyitott leolvasási keretet (*hybA*) vélték a hidrogenáz kis alegységének, ez meglehetősen alacsony homológiát mutat a hidrogenázok kis alegységével. Viszont a *hybA*-tól 5' irányban az első potenciális polipeptid meggyőző módon hasonlít a hidrogenázokhoz, így feltehető, hogy ez kódolja az *E. coli* hidrogenáz2 kis alegységét, s így, mintegy kétszer akkora közbeékelődött szekvencia létezik, mint ahogy a szerzők azt hitték. Ez lényegében hasonló méretű, mint amit mi találtunk *T. roseopersicina hydSL* esetén. A két szekvencia azonban nem mutat különösebb hasonlóságot, s a *T. roseopersicina* KÉSZ-hez hasonló szekvenciák keresése az adatbankokban eddig nem járt eredménnyel. Az összes lehetséges nyitott leolvasási keret (amelyben két kb. 40 kDa-os polipeptid is szerepel) összevetése az ismert szekvenciákkal bizonytalan eredményeket adott. Az egyik motívum feltehetően tartalmaz egy ferredoxin típusú Fe-kén kocka kötő helyet, míg a másik a *D. vulgaris hmc* operonjával (egy transzmembrán redox fehérje) mutat több-kevesebb hasonlóságot. Mindazonáltal egyáltalán nem biztos, hogy fehérje kódoló régióról van szó, és jelenlegi adataink nem elegendőek bármilyen érdemi állásfoglalásra a KÉSZ funkcióját illetően.

#### V/4. 5' és 3' irányú környező szekvenciák

Az irodalmi bevezetőben utaltunk arra, hogy a hidrogenáz struktúrgéneket általában olyan gének veszik körül, amelyek vagy a hidrogenáz érésében vagy expressziójának szabályozásában játszanak szerepet. A *T. roseopersicina hydSL* génektől 3' irányban rendelkezésünkre áll, mintegy 2 kb. hosszú szekvencia, amely nem mutatott semmilyen hasonlóságot az eddig ismert szekvenciákkal. Ideértve a nem-hidrogenáz kapcsolt szekvenciákat is. Hasonló a helyzet a kb. 1 kb. hosszú 5' végi szekvenciával, bár itt a szekvencia analízis még nincs teljesen befejezve. A *hupSL* gének viszont teljes mértékben hidrogenázszerű tulajdonságokat mutattak e tekintetben, hisz a struktúrgéneket körülvevő gének is nagy hasonlóságot mutattak pl. a *R. capsulatus* hidrogenáz megfelelő génjeivel [12]. Érdemes megjegyezni, hogy Southern kísérletekben, melyek ismert Ni beépítő fehérjéket kódoló géneket - mint pl. a *hupNOP* a *B. japonicum*-ban [16] - használtunk próbaként, sem jártak sikerrel, ami felemás összhangban van a fenti eredményekkel.

#### V/5. A két hidrogenáz feltételezett funkciója a *T. roseopersicina*-ban

Az eddigi ismeretek birtokában a két hidrogenáz feltételezett élettani funkcióját a következőkben foglalhatjuk össze:

- 1; A hidrogenáz<sup>2</sup> egy nitrogén fixáló körülmények között indukálódó enzim, mely a nitrogénáz komplex működése során keletkező hidrogént recirkuláltatja energianyerés kíséretében (F<sub>0</sub>-F<sub>1</sub> komplex-szel együtt). Ez a hidrogenáz csak a hidrogén oxidációjának irányában működik.
2. A hidrogenáz<sup>1</sup> funkciója bizonytalanabb, expressziója konstitutívnek tűnik, és minden valószínűség szerint a fotoszintetikus lánc elektronigényét biztosítja a hidrogén gáz oxidációjával.



## VI. 2. Tézispont

### A *T. litoralis* hidrogenázt kódoló gének izolálása és jellemzése

#### VI/1. A gének izolálása

A *T. litoralis* hidrogenáz génejeinek izolálására a következő stratégiát választottuk. Amerikai kooperáló partnerünk, Prof. Mike Adams laboratóriumában a hidrogenázt homogenitásig tisztították, és az alegységek N-terminális szekvenciáit meghatározták. Ez az első táblázatban látható.

Alegység	Aminosav szekvencia
$\beta$	MRYVKLPKEN TYEFLERLKE
$\delta$ (kis)	MENEKVGIGF YALD
$\alpha$ (nagy)	MYIPITVDHI ARVEGKGGIE IVTSDEGV

**1. táblázat.** A *T. litoralis* hidrogenáz alegységeinek aminoterminális szekvenciái.

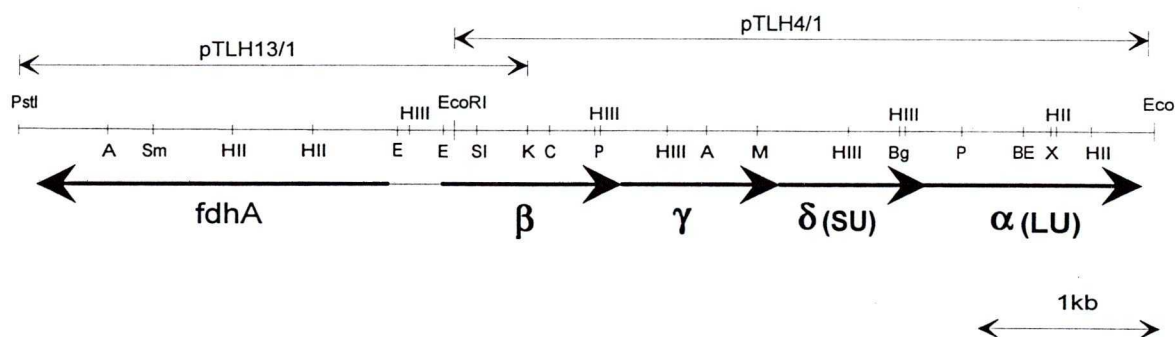
Ezek alapján szintetikus primereket terveztünk, és feltételeztük, hogy a gének sorrendje a kromoszómán megegyezik a hidrogenázokra általánosan jellemző elrendeződéssel, azaz a kis alegység megelőzi a nagy alegységet. Ez a feltevésünk igaznak bizonyult, és sikerült a kis és nagy alegység N-terminális végei közötti kb 0.8 kb-os fragmentumot PCR segítségével előállítani, ami a várákozásnak megfelelően a kis alegység szekvenciáját hordozta (pDA0.8 klón).

*EcoRI* és *BamHI* ezimokkal emésztett *T. litoralis* kromoszómális DNS-ből  $\lambda$  fág könyvtárat készítettünk, és a fenti (jelölt) fragmenttel hibridizáltuk. Két teljesen azonos klónt sikerült izolálni az *EcoRI* könyvtárból, amelyek egy 4kb inszertet hordoztak. Helper fág segítségével kiugrasztottuk az inszertet tartalmazó pBK CMV fagemidet, és így kaptuk 6. ábrán látható pTLH4/1 klónt. Meg kell

jegyezni, hogy az ugrasztás során az inszert rendkívül nagy hajlandóságot mutatott rekombinációra, és sokszor csak deléciókat tartalmazó klónokat sikerült nyerni. Természetesen a pTLH4/1 4 kb. méretű *EcoRI* inszertje összhangban van a *T. litoralis* genomi DNS-sel végzett Southern kísérletek eredményeivel.

Ezt a 4 kb-os régiót szubklónoztuk, és meghatároztuk a szekvenciáját, és kiderült, hogy tartalmazza majdnem mind a négy alegységet, és csak a  $\beta$  alegység N-terminális régiójából hiányzott egy kis darab, és természetesen a szabályozó régió. Azt is megállapítottuk, hogy az alegységek sorrendje megegyezik a *P. furiosus* hidrogenáz esetén talált sorrenddel [32]

Ezért *PstI-KpnI* enzimek segítségével egy 2-4 kb-os parciális könyvtárat készítettünk *T. litoralis* kromoszómális DNS-ből pBluescript vektorban. A pTLH4/1 5' végi darabjával hibridizálva ebből a könyvtárból izoláltuk a pTLH13/1 klónt, ami egy kb. 3 kb-os inszertet tartalmaz, és mintegy 0.5 kb-os darabon átfed a pTLH4/1-gyel (6. ábra). Ezt a szakaszt is szubklónoztuk és meghatároztuk a nukleotid sorrendjét, így összesen 6458 bp hosszú régió szekvenciáját tártuk fel.



**6. ábra.** A *T. litoralis* hidrogenáz kódoló lokusz restriktós térképe, a gének szerveződése.

A: *AccI*, Bg: *BglII*, BE, *BstEII*, C: *ClaI*, E: *EcoRI*, HII: *HincII*, HIII: *HindIII*, K: *KpnI*, M: *MscI*, P: *PstI*, Sm: *SmaI*, SI: *SacI*, X: *XhoI*

## VI/2. A hidrogenáz gének jellemzése

A négy alegységes [NiFe] hidrogenázt kódoló gének egyenként egy 43.292 Da ( $\beta$ ), egy 33.467 Da ( $\gamma$ ), egy 29.709 Da ( $\delta$ ) és egy 48.568 ( $\alpha$ ) Da molekulatömegű polipeptidet kódolnak, amelyből az utóbbi kettő felel meg a Ni-Fe hidrogenázok kis illetve a nagy alegységének. Egyik alegységhez sem tartozik szignál szekvencia, ami egyezésben van a biokémiai adatokkal, hogy a *T. litoralis* hidrogenáza a citoplazmában fordul elő. Hasonlóképpen nincs a nagy alegység végén a membránkötött hidrogenázokra jellemző kb. 15 aminosavból álló peptidszakasz, ami általában a hidrogenáz érése során proteolitikusan lehasad. Mindazonáltal a hisztidin, amelynél a hasítás történni szokott ebben a hidrogenázban is jelen van, ami nagyfokú konzerváltságra utal, s ezt egy rövid VVRL szekvencia követi. Az, hogy ez a oligopeptid lehasad, avagy sem, jelenleg még nem bizonyított. Egyébiránt a mezofil hidrogenázokkal való hasonlóság meglehetősen alacsony, bár a nagy alegység Ni-t kötő ciszteinjei esetünkben is konzerváltak. A kis alegységek esetén is elsősorban a ciszteinek környékén fordulnak elő konzervált szekvencia elemek. Nagyjából átlagos számú cisztein fordul elő a kis alegységben (13), de a hisztidinek száma feltűnően alacsony (3). Ez azért is érdekes, mert a hipertermofil fehérjékben inkább a ciszteinek száma szokott alacsonyabb lenni, mint a mezofilekben.

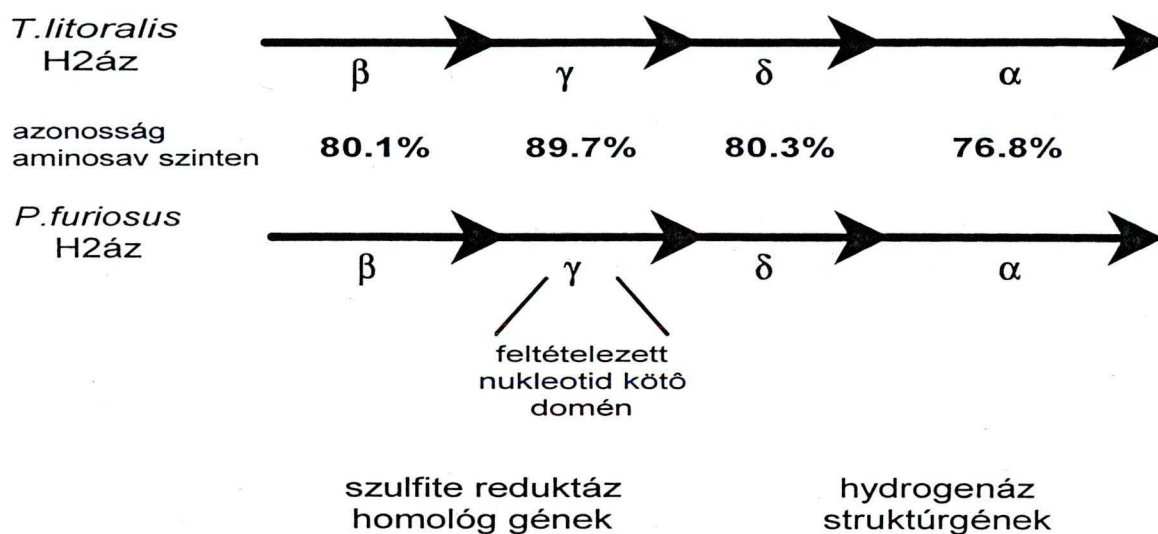
A  $\beta$  és  $\gamma$  alegység a *S. typhimurium* szulfít redukázal (*asrA*, *AsrB*) [20] mutat hasonlóságot csakúgy, mint a *P. furiosus* esetében [32]: Erre a *P. furiosus* hidrogenázzal való összevetéskor még visszatérünk.

## VI/3. A *T. litoralis* és a *P. furiosus* hidrogenáz génjei hasonlóak egymáshoz

A *T. litoralis* hidrogenáz génjei meglehetősen hasonlóak a *P. furiosus* hidrogenáz megfelelő génjeihez (7. ábra). Mint az ábráról leolvasható az  $\alpha$



alegység mutat a legkisebb hasonlóságot (76.8 %), ami figyelembe véve a két sejtvonaltól közeli rokonságát, valamint a többi alegység magasabb homológiáját információ értékű lehet. Magyarázatul szolgálhatna például a két hidrogenáz eltérő stabilitására (a *T. litoralis* hidrogenáz kevésbé stabil), de ez egyelőre csak spekuláció.



7. ábra. A *T. litoralis* és *P. furiosus* hidrogenáz gének összehasonlítása

Annál feltűnőbb viszont a  $\gamma$  alegység nagyfokú hasonlósága (89.7%). A *P. furiosus* hidrogenáz esetén ezen az alegységen belül jelölték ki a feltételezett nukleotidkötő domént, ami a NADPH kötéséért volna felelős. Ez a domén a két fehérje esetén 100%-ban azonos, ami teljeses ellentétes a várakozásainkkal (8. ábra).

A *T. litoralis* hidrogenáz biokémiai jellemzéséből az derült ki, hogy ez a fehérje nem képes nukleotid típusú elektrondonorokat használni, hanem csak ferredoxint. Ennek megfelelően plauzibilis volt feltételezni, hogy a két enzimet kódoló gének abban fognak különbözni, hogy a  $\gamma$  alegységben azonosított nukleotid kötő domén valahogy sérült, és ez az oka annak, hogy a *T. litoralis*

hidrogenáz csak ferredoxint képes oxidálni. A domének azonossága arra enged következtetni, hogy a két enzim ugyanazokat a szubsztrátokat képes hasznosítani, és valószínűleg a működési mechanizmus is hasonló. Mindazonáltal az továbbra is kérdés marad, hogy mi ez a szubsztrát, mert a NADPH-t leírták ugyan, mint a *P. furiosus* hidrogenázának egyedüli és kizárólagos elektrondonorját [26], de a tényekhez az is hozzátartozik, hogy a NADPH a *P. furiosus* növekedési hőmérsékletén *in vitro* körülmények között nem stabil (néhány perc a felezési ideje). Az ellentmondást speciális nukleotid stabilizáló faktorok jelenthetnék, vagy olyan redox tulajdonságú nukleotidok, amelyek a kérdéses hőmérsékleten stabilak. Ilyen pl. a FAD, vagy a FMN. E mellett szól az is, hogy a *T. stetteri*-ből izolált Ni-Fe hidrogenáz tartalmazott FMN kofaktort.

#### VI/4. Létezik egy második nukleotid kötő domén a $\gamma$ alegységen belül

A biokémiai és genetikai adatok ellentmondásossága a  $\gamma$  alegységet illetően ösztönzött bennünket arra, hogy megvizsgáljuk, hogy a feltételezett nukleotid kötő régiók mennyire felelnek meg az általános szabályoknak. Az eredeti elképzelés szerint [44], a nukleotid kötő doménnek egy 11 pontból álló kritérium rendszert kell kielégítenie, amelyből minimálisan 9-nek teljesülnie kell, hogy szignifikáns kijelentést tehesünk. A szerzők szerint a domén magjában egy GXGXXG motívum jelenléte alapvető fontosságú: Ezen kritériumok alapján megvizsgálva a  $\gamma$  alegységeket találtunk egy másik potenciális nukleotid kötő domént, amely a fenti elvek alapján 9 pontot ért el, és tartalmazza a fenti szekvencia részletet, míg a [32] által kijelölt régió csak 7 pontot kapott (8. ábra), és nincs benne a fenti motívum. Így, ha van nukleotid kötő domén, valószínűleg az az általunk kijelölt szakasz. Nincs kizárva azonban, hogy mind a két domén aktív szerepet játszik, és az egyik domén a flavin típusú, a másik pedig a NADH/NADPH típusú nukleotidokat köti. Ilyen mechanizmust találtak az *A. eutrophus* négyalegységes hidrogenáza [40], valamint a *D. fructosovarians* NADP redukáló hidrogenáza esetén [27]. Az, hogy egy hipertermofil hidrogenázban olyan domén található, amely szignifikánsan





VI/5. A *T. litoralis* hidrogenáz génektől 5' irányban szomszédos gén  
egy formát dehidrogenázt kódoló gén

Mint korábban többször utaltunk rá a hidrogenáz struktúrgéneket általában olyan gének veszik körül, amelyek az enzim érésében vagy expressziójának szabályozásában játszanak szerepet. Ezért egy kb. 2.5 kb-os régió szekvenenciaanalízisét is elvégeztük a  $\beta$  alegységtől 5' irányban. Ennek a szekvenciának az adatbankokban rendelkezésre álló szekvenciákkal való összevetése azt sejtette velünk, hogy formát-dehidrogenáz génekkel hasonló szekvenciával van dolgunk. S valóban, a hidrogenáz génekkel ellentétes irányban van egy nyitott leolvasási keret, amely nagyfokú hasonlóságot mutat többek között a metanogén archaeon *Methanobacterium formicium* formát-dehidrogenáz vagy az *E. coli* formát-dehidrogenáz A alegységével. A 462 aminosavból álló, 55.055 Da molekulatömegű polipeptid 33 - 43 % aminosav azonosságot mutat az adatbankokban található formát-dehidrogenáz A génekkel. Elképzelhető egy olyan mechanizmus, melyben a formát  $\text{CO}_2$ -vé oxidálása szolgáltatná az elektronokat a hidrogenáz számára a  $\text{H}_2$  fejlesztéséhez. Ez azonban még további vizsgálódásokat igényel. Az valószínű, hogy a hidrogenáz gének és a formát-dehidrogenáz gének expressziója független egymástól, hisz a transzkripciójuk ellenkező irányban megy végbe. Mindenesetre elmondható, hogy ez az első formát-dehidrogenázt kódoló gén a *Thermococcales* fajokban, sőt nem találtunk ilyen gént a nem-metanogén hipertermofil mikroorganizmusok körében. A metanogének esetében a formát oxidációja szolgáltatja az elektronokat a  $\text{CO}_2$  metánná történő redukciójához.

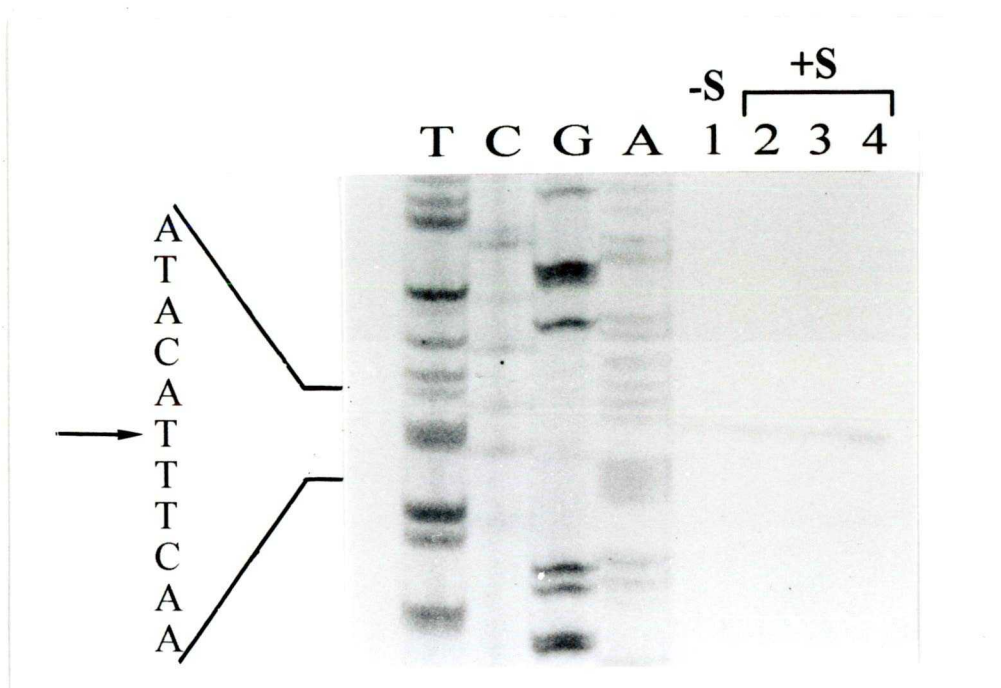
## VI/6 . *A T. litoralis hidrogenáz génjei egy transzkripciós egységet képeznek, és az expressziót a kén nem befolyásolja*

Northern blot segítségével bizonyítottuk, hogy a hidrogenáz négy alegységét kódoló gének egy transzkripciós egységet képeznek. Bár a várt fragment mérete némileg kisebb a vártnál (kb. 3.5 kb), ez minden bizonnyal részben elektroforetikus anomáliáknak, részben annak tudható be, hogy a hipertermofil RNS-k sokkal több módosításokat tartalmaznak, mint a mezofil RNS-k. Igazoltuk azt is, hogy a hidrogenáz gének expressziója nem függ a tenyésztési közeg kén tartalmától. Ehhez tRNS-t tisztítottunk olyan sejtekből, amelyek kénnel illetve kén nélkül nőttek, és egyenlő mennyiségű tRNS-eket vittünk fel a denaturáló agaróz géltre és végeztük el a Northern blottot. A kísérleti hibán belül egyforma intenzitású sávokat kaptunk, ami azt jelenti, hogy - habár a hidrogenáznak a kén szubsztrátja lehet [24], a kén a gének expressziójára nincs hatással. Azaz, a hidrogenáz szempontjából érdektelen, hogy kenet, vagy protont kell redukálni.

## VI/7. *A T. litoralis hidrogenáz mRNS-e egy hosszú nem transzlálódó régiót tartalmaz*

Primer extenziós kísérletekkel igazoltuk, hogy a transzkripciós iniciációs pont "A" (9. ábra), és ez -139 bp-ra van a transzlációs iniciációs ponttól (10. ábra). Ez a hosszú nem transzlálódó régió komplikált másodlagos szerkezeteket képez, és ezért véleményünk szerint a mRNS stabilizálásában van szerepe. A transzkripciós iniciációs pont nem függ a közeg kéntartalmától, tehát ugyanaz a mRNS-e a hidrogenáznak és a szulfhidrogenáznak egyaránt (9. ábra). Ez merőben új eredmény, mert a *P. furiosus* esetében a transzkripciós iniciációs pontot az első metioninhoz sokkal közelebbi "G"-nek tippelték [32]. A 10. ábrán bekereteztük a potenciális TATA boxokat. Véleményünk szerint a középső TATA-típusú

szekvenciaelem szolgál a promoter magjaként a hidrogenáz gének transzkripciójához.



**9. ábra.** Primer extenziós kísérletek a *T. litoralis* hidrogenáz mRNS-én  
 1-3: különböző RNS preparátumok, 1. a tenyésztési közeg nem tartalmazott kenet,  
 2-3 kén jelenlétében növesztett sejtekből, de független preparátumok, 4: ugyanaz  
 az RNS, mint 3 esetén, de a jelölést  $\alpha^{35}\text{S}$ -dATP-vel és nem  $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP-vel  
 végeztük, mint 1-3 esetén.





VI/8. A *Thermococcales* hidrogenázok külön csoportot képeznek

Eredeti célkitűzésünknek megfelelően összehasonlítottuk a *T. roseopersicina* instabil, stabil hidrogenáz génjeinek a szekvenciáját a *T. litoralis* termostabil hidrogenáz génjeivel. Sajnálatos módon olyan alacsony hasonlóságot kaptunk a *T. roseopersicina* és *T. litoralis* hidrogenázai között, ami lehetetlenné teszi komoly következtetések levonását.

```

F F P P A C I H V Q L C P R D H K C S Q
TTTTTCCCTCCAGCATGTATACATGTACAATTATGTCACCGTGATCATAAGTGTTCCCAG
      |----->
I * L Y V K F L R I L * T F G W K T K G
ATCTAGTTATATGTAAAGTTTTTAAGAATTCTCTAAACCTTTGGTTGGAAAATAAGGGT

L E S F F M G F * V L * L M F N V Q N N
TTAGAAAGCTTTTTTATGGGATTTTAAGTATTATAATTGATGTTTAATGTACAAAATAAC

S L L F I A * K K E V M E L R Y V K L P
TCGCTATTGTTTCATAGCTTAGAAAAAAGAGGTGATGGAGTTGAGGTATGTTAAGTTGCCG

K E N T Y E F L E R L K E W G T L Y A P
AAGGAGAATACTTACGAGTTCCTAGAGCGCCTGAAGGAGTGGGGGACACTTTATGCCCCA

V K I S E K F Y D F R E V E D M S Q I E
GTAAAATCTCGGAGAAGTTCTACGACTTCAGAGAAGTTGAAGACATGAGTCAAATAGAA

F K Y N R T I M ...
TTCAAATATAACAGGACAATAATG...

```

**10. ábra.** A *T. litoralis* hidrogenáz  $\beta$  alegységének transzkripció és transzláció iniciációs pontja. A lehetséges TATA boxokat bekereteztük.

Általában elmondható, hogy a *T. litoralis* és a *P. furiosus* hidrogenázai egymáshoz nagyon, viszont más hidrogenázokhoz csekély mértékben hasonlítanak, így

valószínűleg a hidrogenázok következő csoportosításakor már külön osztály fognak képezni. Az adatbankokban található szekvenciákkal történő összehasonlítás még leginkább a metanogén (pl. *Methanococcus janischii*) hidrogenázokat hozta ki legközelebbi rokonnak, de ez hasonlóság sem túlságosan kifejezett.

A *T. roseopersicina* hidrogenáz1 és 2 összehasonlítása már sokkal ígéretesebb, hisz aminosav szinten a kis alegységek 46%-ban, míg a nagy alegységek 57.7%-ban azonosak. Ez a majd 10% hasonlósági különbség azt sejteti, hogy a fehérjék tulajdonságaiban rejlő különbségek elsősorban a kis alegységeken belül keresendők. Ezt kiméra hidrogenázok előállításával lehetne igazolni, amelyekben a kis és nagy alegységeket kicserélnék a hidrogenáz1 és 2 között.

## VII. 3. Tézispont

### Módszer kifejlesztése hipertermofil mikroorganizmusok izolált telepekben való tenyésztésére

#### VII/1. Bevezetés

Hipertermofil mikroorganizmusokkal való laboratóriumi munka technikailag sokkal problematikuabb, mint pl. az *E. coli*-val dolgozni. A tenyésztési körülmények sokkal bonyolultabbak, mint egy mezofil mikroorganizmus esetén ráadásul sokszor anaerob körülmények között kell dolgozni. Ezért izolált telepeket sokáig nem is sikerült előállítani, ehelyett folyadék kultúrákban lehetett csak tenyészteni a hipertermofil törzseket [7, 50], ami természetesen gyakran kevert tenyészetek kialakulásához vezetett. A hipertermofil mikroorganizmusokban történő genetikai manipulációkhoz viszont elengedhetetlen izolált kolóniák előállítása. Hagyományos agart tartalmazó lemezelési technika erre nem alkalmas, mert a lemez megolvad, majd elveszti víztartalmát és beszárad. Wiegel [50] adott egy áttekintést a magas hőmérsékleten szilárd felületeken, pl. keményítő, szilikagél, vagy Gelrite való mikroorganizmus tenyésztés nehézségeiről. A keményítővel és szilikagéllal meglehetősen nehézkes és fáradtságos dolgozni, ezért ezek nem terjedtek el igazán. A Gelrite-ot (Kelco Division, Merck) *Pseudomonas* törzsből tisztították, és  $Mg^{2+}$  illetve  $Ca^{2+}$  jelenlétében szilárdul meg. Ezért a különböző táptalajokra minden esetben optimalizálni kell a lemez készítési protokolt. Másik hátránya, hogy viszonylag gyorsan csökken a víztartalma, ami a lemez beszáradásához illetve a kolóniák elmosódásához vezet.

#### VII/2. *Phytigel és alginát keveréke a megoldás magas hőmérsékleten is stabil lemezek előállítására*

Phytigel a Sigma terméke, és könnyebben önthető belőle lemez, mint a Gelrite-ból, nem kell túl gyors polimerizációtól tartani. Némi gyakorlattal 1-1,5 %-os lemez rutinszerűen készíthető. Minél magasabb a Phytigel koncentrációja,



annál kisebb a víz elpárolgásából származó veszteség. A Phytigel-ből készült lemezek 95 °C fölött sem olvadnak meg. Az alginát egy mikrobiális poliszaharid (BDH), 0,2-0,3 % koncentráció tartományban adagolva csökkenti a Phytigel lemezek dermedési sebességét, így még biztonságosabban, könnyebben lehet lemezeket önteni. Az alginát  $\text{Ca}^{2+}$  jelenlétében háromdimenziós térhálós szerkezetet vesz fel, amelynek kölcsönhatása a Phytigel polimerrel egyelőre még nem tisztázott [35].

A lemezek magas hőmérsékleten tartása óhatatlanul vízveszteséghez vezet. Hermetikusan zárható dobozba nem szabad bezárni a lemezeket, mert akkor a vízgőz kondenzálása a kolóniák szétkenődéséhez vezet. A lemezek hagyományos módon, de magas hőmérsékleten való tartása pedig a lemez beszáradásához vezet. Ezekre a problémákra megoldást jelent, ha a lemezeket olyan alumínium hengerbe rakjuk, amelynek a fedelébe belülről szilikon gumit ragasztunk. Az így összeállított alumínium edény elég zárt ahhoz, hogy a víz teljes elpárolgását, a lemez beszáradását megakadályozza, viszont nem hermetikusan zárt, ezért a felesleges vízgőz el tud távozni [35]. Hermetikusan zárt edények azért sem használhatóak, mert pl. a *Thermococcales* sejtvonalak növekedésük során gázt fejlesztenek, és ennek a gáznak az eltávolítását biztosítani kell, különben túlnyomás alakul ki.

Az fenti módon öntött, és tárolt lemezeket 10-14 napig probléma mentesen lehet tárolni 85-95 °C-on, ami a legtöbb feladat megoldásához bőségesen elegendő. Hosszabb inkubációs idő a lemezek jelentős barnulását okozhatja, ami feltehetően valamelyik tápanyag komponens bomlásának következménye [35].

Mi általában anaerob sejtekkel dolgozunk (*Thermococcales* sejtvonalak), ami azt követeli meg, hogy az összes műveletet anaerob körülmények között hajtsuk végre. Erre a Sheldon cég (Kanada) magas hőmérsékletű, anaerob fülkáját használjuk, amelyben 95 %  $\text{N}_2$  + 5 %  $\text{H}_2$  gázkeverékben 30 - 100 °C hőmérséklet tartományban tuduk inkubálni a tenyészeteket.

Rutinszerűen tudunk lemezelni *T. litoralis*, *P. furiosus*, *Thermococcus JDF3* törzseket, amelyek heterotróf módon nőnek 86 - 100 °C tartományban . Mivel az alginát is és a Phytigel is szerves anyag, és az autoklávozás során némi bomlásuk előfordulhat, ezért autotróf módon növekedő sejtek tanulmányozására ez a rendszer nem alkalmas. Mindazonáltal a laboratóriumokban leggyakrabban előforduló feladatokra kiválóan alkalmazható tehát jelentős lépés a hipertermofil mikrobiológia illetve rekombináns technika, genetikai rendszerek kidolgozásában.

## VIII. ÖSSZE G Z É S

A termostabil hidrogenázok területén végzett kutatásainkat főbb eredményeit az alábbiakban foglalhatjuk össze:

1. Izoláltuk és jellemeztük a *T. roseopersicina* stabil, kétalegységes Ni-Fe hidrogenázát kódoló géneket.
2. Megállapítottuk, hogy a struktúrgének elrendeződése szokatlan tulajdonságokat mutat: a kis és nagy alegységet kódoló gének közé egy 2 kb hosszúságú DNS fragment ékelődik. Ilyen jellegű szerveződést korábban egyedül az *E. coli* hidrogenáz2 esetén írtak le [29]. Ennek a közbeékelődött szekvenciának a funkciója egyelőre nem ismert, és további vizsgálódásokat igényel.
3. A struktúrgénektől 5' és 3' irányban elhelyezkedő szekvenciák analízise nem eredményezett semmilyen hasonlóságra az adatbankokban található génekkel. Ez azért lehet jelentős, mert egy potenciális magyarázat a jelenségre az lehet, hogy a stabil hidrogenáz aktív formájának kialakulásában a nem-stabil hidrogenáz segédgénjei vesznek részt. Ez - ha így van - hasznos lehet kiméra rekombináns hidrogenázok tervezésekor és előállításakor.
4. Molekuláris biológiai eszközökkel is bizonyítottuk, hogy a hidrogenáz1 is membrán kötötten fordul elő a sejten belül.
5. Ez az első eset, hogy 2 hidrogenáz jelenléte egy fotoszintetikus baktériumon belül mind biokémiai, mind genetikai eszközökkel bizonyítást nyert.
6. Izoláltuk, és jellemeztük a *T. litoralis* 4 alegységes citoplazmatikus Ni-Fe hidrogenázát kódoló géneket.



7. Nagyfokú hasonlóságot találtunk a *P. furiosus* és *T. litoralis* hidrogenázok génjei és ezek szerveződése között, habár a nagy alegységek közötti hasonlóság a szokásosnál alacsonyabb (76,8 %).

8. A biokémiai adatokkal ellentétben valószínűsítettük, hogy mind a *P. furiosus* mind a *T. litoralis* hidrogenáza hasonló, valószínűleg nukleotid típusú szubsztrátot használ elektronodonorként.

9. Azonosítottunk egy új, a korábban javasolttól [32] eltérő nukleotid kötő helyet mind a *P. furiosus*-ban mind a *T. litoralis*-ban, ami jobban megfelel a nukleotid kötő doménekkel szembeni elvárásoknak, mint az irodalomban leírt kötőhely.

10. Bizonyítottuk, hogy a *T. litoralis* hidrogenáz négy génje egy transzkripciós egységet képez, és a transzkripcóját a kén nem szabályozza.

11. Meghatároztuk a *T. litoralis* hidrogenáz mRNS-ének transzkripciós iniciációs pontját, és ezt 5' irányban 139 bp-ra találtuk a translációs start ponttól. Erről a viszonylag hosszú nem-transzlálódó régióról az RNS másodlagos szerkezete alapján feltételeztük, hogy a mRNS stabilizálásában játszhat szerepet.

12. A *T. litoralis* hidrogenáz génjeitől 5' irányban azonosítottunk egy formát-dehidrogenáz A típusú gént, ami az első azonosított, nem-metanogén, hipertermofil eredetű formát-dehidrogenáz gén. Ennek az átíródása ellentétes a hidrogenáz gének transzkripciójának irányával, ami azt jelenti, hogy expressziójuk független. Feltételezhető, hogy a formát oxidációjából származó elektronokat a hidrogenáz a proton vagy kén redukciójára fordítja. További következtetésként az is levonható, hogy a hidrogenáz génektől 5' irányban - legalábbis 2 kb-on belül - nincs olyan fehérje génje, amely az aktív hidrogenáz kialakulásához szükséges.

13. Megállapítottuk, hogy a *Thermococcales* hidrogenázok szekvenciája jelentős mértékben eltér más típusú hidrogenázok szekvenciájától, és valószínűleg a hidrogenázok között külön csoportot fog képezni. Nem találtunk meggyőző hasonlóságot a *T. roseopersicina* stabil hidrogenáza és a *T. litoralis* hidrogenáza között.

14. Eljárást dolgoztunk ki hipertermofil mikroorganizmusok egyedi telepeken való tenyésztésére szilárd felületen, ami az első lépések egyike a hipertermofil genetikai rendszerek kifejlesztése felé vezető úton.

## T O V Á B B I T E R V E K

A *T. roseopersicina* hidrogenázokkal kapcsolatban a következő molekuláris biológiai munkákat tervezzük:

- A stabil hidrogenáz transzkripciós analízise, KÉSZ funkciójának megállapítása,
- az instabil hidrogenáz transzkripciós analízise, az indukálhatóság bizonyítása transzkripciós szinten
- genetikai rendszer kifejlesztése *T. roseopersicina*-ra,
- hidrogenáz struktúrgénekben mutáns törzsek előállítása, hidrogenázok mutagenézise, kiméra hidrogenázok konstrukciója,
- aktív rekombináns hidrogenáz termeltetése,
- a stabil hidrogenázt övező szekvenciarégió analízisének folytatása.

A *T. litoralis* hidrogenázzal kapcsolatban pedig a terveink:

- a génektől 3' irányban elhelyezkedő szekvenciák, gének analízise
- a  $\gamma$  alegység nukleotid kötésének *in vitro* analízise. Ehhez a konstrukciók már készen vannak túltermeltető vektorban mind *T. litoralis*-ra, mind *P. furiosus*-ra. Triciált nukleotidokkal kívánjuk az alegység nukleotid kötő képességét tesztelni.
- Vektorrendszer kifejlesztése hipertermofil mikroorganizmusokra.



- *T. litoralis* hidrogenáz- mutáns előállítása. Ezen belül kíváncsiak vagyunk arra is, hogy valóban mind a négy alegység szükséges-e a hidrogenáz aktivitáshoz, azaz,  $\beta$ ,  $\gamma$  alegységben deléciós mutánsok jellemzése.

- rekombináns hipertermofil hidrogenáz előállítása.

A fenti feladatok végül majdnem az egész csoport terveit jelentik, amit még kiegészítenénk a fehérjék analízise terén ránk váró feladatokkal:

- a hidrogenáz<sup>2</sup> fehérje alegységeinek N-terminális szekvencia analízise,

- a *T. roseopersicina* stabil hidrogenáz kristályosítása, a háromdimenziós szerkezet modellezése.

- a *T. litoralis* hidrogenáz röntgendiffrakciós analízise.

Ez utóbbi két projektre ígéretes kooperációink vannak, s reményeink szerint sikerül is megvalósítani őket.



## IRODALOM

- [1] Adams, M.W.W.  
Biochem. Biophys. Acta, **1020**, 115-145(1990)
- [2] Adams, M.W.W  
FEMS Microbiol. Rev. **75**, 219-238
- [3] Albracht, S.P.J.  
Biochem. Biophys. Acta, **1188**, 167-204
- [4] Ausubes, F.M.; R. Brent; R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman;  
J.A. Smith; K. Struhl  
Curr. Prot. in Mol. Biol. John Wiley&Sons Inc.
- [5] Bagyinka Cs.; Z. Szőkefalvi-Nagy; I. Demeter; K.L. Kovács  
Biochem. Biophys. Res. Comm. **162**, 422-426(1989)
- [6] Binder, U.; T. Maier; A.Böck  
Arch. Microbiol. **165**, 69-72(1996)
- [7] Blöchl, E.; S. Burggraf; G. Fiala; G. Laurer; G. Huber; R. Huber;  
R. Rachel; A. Segerer; K.O. Stetter; P. Völkl  
World J. Microbiol. Biotechnol. **11**, 9-16(1995)
- [8] Bryant, F.O.; M.W.W. Adams  
J. Biol. Chem. **264**, 5070-5079(1989)
- [9] Cammack, R.; V.M. Fernandez; K. Schneider  
Bichimie, **68**, 85-91(1986)
- [10] Cammack, R.; Cs. Bagyinka; K.L. Kovács  
Eur. J. Biochem., **182**, 357-362(1989)
- [11] Carrasco, C.D.; J.A. Buettner; J.W. Golden  
Proc. Natl. Acad. Sci., **92**, 791-795(1995)
- [12] Colbeau, A.; K.L. Kovács; J. Chabert; P.M. Vignais  
Gene, **140**, 25-31(1994)
- [13] Deckers, H.M.; F.R. Wilson; G. Voordouw  
J. Gen. Microbiol., **136**, 2021-2028(1990)

- [14] Engler-Blum, G; M. Meier; J. Frank; G.A. Müller  
Anal. Biochem. **210**, 235-244(1993)
- [15] Friedrich, B.; E. Schwartz  
Annu. Rev. Microbiol., **47**, 351-383(1993)
- [16] Fu, C.; S. Javedan; F. Moshiri; R.J. Maier  
Proc. Nat. Acad. Sci., **91**, 5099-5103(1994)
- [17] Gogotov, I.N.; N.A. Zorin; L.T. Serebriakova; E.N. Kondratieva  
Bichem. Biophys. Acta, **523**, 335-343(1978)
- [18] Gollin, D.J.; L.E. Mortenson; L.R. Robson  
FEBS Letters, **309**, 371-375(1992)
- [19] Juszczak A.; A. Shigetoshi; M.W.W. Adams  
J. Biol. Chem., **266**, 13834-13841(1991)
- [20] Huang, C.J.; E.L. Barrett  
J. Bacter. **173**, 1544-1553(1991)
- [21] Kovács, K.L.; Cs. Bagyinka; G. Tigyi  
Biochem. Biophys. Acta **935**, 166-172(1988)
- [22] Kovács, K.L.; Cs. Bagyinka  
FEMS Microbiol. Rev., **87**, 407-412(1990)
- [23] Kovács, K.L.; G. Tigyi; L.T. Thanh, S. Lakatos, Z. Kiss, Cs. Bagyinka  
J. Biol. Chem., **266**, 947-951(1991)
- [24] Ma, K.; R.N. Schicho; R.M. Kelly; M.W.W. Adams  
Proc. Natl. Acad. Sci. **90**, 5341-5344(1993)
- [25] Ma, K.; M.W.W. Adams  
J. Bacter. **176**, 6509-6517(1994)
- [26] Ma, K.; Z.H. Zhou; M.W.W. Adams  
FEMS Microbiol. Lett. **122**, 245-250(1994)
- [27] Malki, S; I. Saimmaime; G. deLuca; M. Rousset; Z. Dermoun; J.-P. Belaich  
J. Bacter. **177**, 2628-2636(1995)
- [28] Menon, A. L.; L. W. Stults; R. L. Robson; L. E. Mortenson  
Gene **96**, 67-74(1990)

- [29] Menon, N.K.; C.Y. Chatelus; M.Dervartanian; J.C. Wendt; K.T. Shanmugam; H.D. Peck. Jr.; A.E. Przybyla  
J. Bacter. **176**, 4416-4423(1994)
- [30] Neuner, A.; H.W. Jannasch, S. Belkin; K.O. Stetter  
Arch. Microbiol. **153**, 205-207(1990)
- [31] Przybyla, A.E.; J. Robbins, N. Menon; H.D. Peck Jr.  
FEMS Microbiol. Rev., **88**, 109-136(1992)
- [32] Pedroni, P.; A.D. Volpe; G. Galli; G. Mura; C. Patresi; G. Grandi  
Microbiology **141**, 449-458(1995)
- [33] Rákhely, G.; K.L. Kovács  
Anal. Biochem., **243**, 181-183(1996)
- [34] Rákhely, G; A. Colbeau; J. Garin; P.M. Vignais; K.L. Kovács  
Unusual Gene Organisation of *hydSL*, the Stable [NiFe] Hydrogenase in the Photosynthetic Bacterium, *Thiocapsa roseopersicina*  
J. Bact. publikálásra beküldve
- [35] Rákhely, G.; M.W.W. Adams; K.L. Kovács  
Molecular Biological Characterisation of the Gene Locus Encoding for the Hydrogenase of *Thermococcus litoralis*  
Eur. J. Biochem. publikálásra beküldve
- [36] Robb, F.T.; A.R. Place szerk.  
Archaea, Laboratory Manual, Thermophiles  
Cold Spring Harbor Laboratory, 1995
- [37] Sambrook, J., E.F.Fritsch, T. Maniatis  
Molecular Cloning. A laboratory manual  
Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA 1989.
- [38] Sayavedra-Soto, L.A.; G.K. Powell; H.J. Evans; R.O. Morris  
Proc. Natl. Acad. Sci. **85**, 8395-8399(1988)
- [39] Stetter, K.O.; G. Fiala; G. Huber; R. Huber; A. Seegerer  
FEMS Microbiol. Rev., **75**, 117-124(1990)
- [40] Tran-Betcke, A.; U. Warnecke; C. Böcker; C. Zaborosch; B. Friedrich  
J. Bacter., **172**, 2920-2929(1990)
- [41] Vignais, P.M.; B. Toussaint  
Arch. Microbiol., **161**, 1-10(1994)



- [42] Vignais P.M.; B. Dimon; N.A. Zorin; A. Colbeau; S. Elsen  
J. Bacter. **179**, 290-292(1997)
- [43] Volbeda, A.; M.-H. Charon, C. Piras, E.C. Hatchikian, M. Frey,  
J.C. Fontecilla-Camps  
Nature, **373**, 580-587(1995)
- [44] Wierenga, R.K.; P. Terpstra; W.G.J. Hol  
J. Mol. Biol. **187**, 101-107(1986)
- [45] Wolfram, L.; B. Friedrich; T. Eitinger  
J. Bacter. **177**, 1840-1843(1995)
- [46] Woodward, J.; S.M. Mattingly; M. Danson; D. Hough; N. Ward;  
M.W.W. Adams  
Nature Biotech. **14**, 872-874(1996)
- [47] Wu, L.-F.; M.A. Mandrand  
FEMS Microbiol. Rev., **104**, 243-270(1993)
- [48] Zirngibl, C.; W. van Dongen; B. Schwörer; R. von Büнау; M. Richter;  
A. Klein; R.K. Thauer  
Eur. J. Biochem., **208**, 511-520(1992)
- [49] Zorin, N.A.; M. Medina; M.A. Pusheva; I.N. Gogotov; R. Cammack  
FEMS Microbiol. Lett. **142**, 71-76(1996)
- [50] Wiegel, J.  
in Thermophiles: General, Molecular and Applied Microbiology  
(Brock, T.D. szerk.) 17-37(1986), Wiley, New York

## K Ö S Z Ö N E T N Y I L V Á N Í T Á S

Őszinte hálával és köszönettel tartozom főnökünknek

**Prof. Kovács L. Kornélnak,**

akit mind szakmai, mind emberi oldalról mesteremnek tekintek. Az Ő önzetlen segítsége, bölcs tanácsai nélkül ez a dolgozat soha nem készülhetett volna el.

Hálás vagyok Dr. Bagyinka Csabának, tanácsaiért, hasznos észrevételeiért, a számítógépes munkában való segítségéért.

Köszönettel tartozom az egész ún. "Hidrogenáz csoportnak" odaadó segítségükért, s kiemelten az asszisztenseinknek

Hódos Etelkának

aki a szekvenciák meghatározásában szerzett elévülhetetlen érdemeket.

Verebélyné Rózsának

aki a mikrobiológiai munkákban nyújtott pótolhatatlan segítséget

Rajtik Erikának oroszlánrésze volt

az adminisztrációs munkákban

Köszönöm Etikének, fotósunknak az ábrák elkészítésében nyújtott igényes munkáját.

Köszönettel tartozom Prof. Ormos Pálnak, az MTA Szegedi Biológiai Központ Biofizikai Intézet Igazgatójának, aki lehetővé tette, hogy az intézetében dolgozhassam.

S végül, de nem utolsósorban családomnak a türelmükért, megértő magatartásukért tartozom köszönettel.

.....  
Rákhely Gábor