

HIDROGÉN METABOLIZMUSBAN SZEREPET
JÁTSZÓ GÉNEK ÉS GÉNTERMÉKEK VIZSGÁLATA
THERMOCOCCUS LITORALIS-BAN

Doktori értekezés

Készítette:

Takács Mária

Témavezetők:

Prof. Kovács L. Kornél
Dr. Rákhely Gábor

Szegedi Tudományegyetem Biotechnológiai Tanszék
MTA SzBK Biofizikai Intézet

Szeged
2006

Tartalomjegyzék

<u>Rövidítések jegyzéke</u>	5
<u>Bevezetés</u>	6
<u>1. Irodalmi áttekintés</u>	7
<u>1.1. A hidrogenázok jellemzése</u>	7
<u>1.1.1. A hidrogenázok által katalizált reakció és fiziológiás szerepük</u>	7
<u>1.1.2. A hidrogenázok felosztása</u>	7
<u>1.2. A [NiFe] hidrogenázok szerkezete, működése, bioszintézise</u>	14
<u>1.2.1. Az aktív centrum és a reakció molekuláris mechanizmusa</u>	14
<u>1.2.2. A nagy alegység érése</u>	15
<u>1.2.3. A kis alegység [FeS] klasztereinek bioszintézise</u>	18
<u>1.2.4. Hidrogenáz génklaszterek</u>	19
<u>1.3. <i>Thermococcus litoralis</i></u>	19
<u>1.3.1. Archaeobaktériumok általános jellemzése</u>	19
<u>1.3.2. A <i>Thermococcaceae</i> család tagjainak metabolizmusa</u>	20
<u>1.3.3. A <i>Pyrococcus furiosus</i> hidrogenázai és a sejt metabolizmusában játszott szerepük</u>	22
<u>1.3.4. <i>Thermococcus litoralis</i> DSM 5473 és hidrogenázai</u>	24
<u>2. Célkitűzések</u>	26
<u>3. Anyagok és módszerek</u>	27
<u>3.1. Baktérium törzsek és nevelésük</u>	27
<u>3.2. DNS-sel végzett munkák</u>	28
<u>3.2.1. Kromoszómális DNS tisztítása</u>	28
<u>3.2.2. Plazmid DNS tisztítás <i>E. coli</i>-ből</u>	28
<u>3.2.3. DNS manipuláció, transzformáció, konjugáció</u>	29
<u>3.2.4. DNS fragment izoláció gélből</u>	29
<u>3.2.5. Polimeráz láncreakció</u>	29
<u>3.2.6. Real-Time PCR</u>	29
<u>3.2.7. Southern blot, kolónia- és plakkehibridizáció</u>	29
<u>3.2.8. Nukleotidsorrend meghatározása</u>	30
<u>3.3. A <i>T. litoralis</i> <i>hypCD</i> géneket kódoló genomrégió izolálása</u>	30
<u>3.4. A <i>T. litoralis</i> <i>hyh</i> operontól 5' irányban elhelyezkedő genomrégió izolálása</u>	30
<u>3.5. A dolgozatban szereplő konstrukciók készítésének menete</u>	31
<u>3.5.1. A heterológ komplementáció során használt plazmid konstrukciók készítése</u>	31
<u>3.5.2. pHypC konstrukció készítése</u>	31
<u>3.5.3. pET32a+<i>fhlB</i> konstrukció készítése</u>	31
<u>3.6. RNS-sel végzett munkák</u>	32
<u>3.6.1. RNS izolálás</u>	32
<u>3.6.2. Primer extenzió</u>	32

3.6.3. Reverz transzkripció	32
3.7. Fehérjével végzett munkák	32
3.7.1. Egydimenziós poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE)	32
3.7.2. Fehérjégél festés	32
3.7.3. Fehérjekoncentráció meghatározása Lowry szerint (Micro Lowry method)	32
3.7.4. Bakteriofág T7 RNS polimeráz alapú fehérje expressziós kísérletek	33
3.7.5. <i>trx-FhlB-His</i> fúziós fehérje túltermelése pET (T7 RNS polimeráz) expressziós rendszerrel	33
3.7.6. His-tag fúziós fehérje tisztítása IMAC (Immobilised Metal-Chelate Affinity Chromatography) módszerrel	33
3.7.7. Kerámia hidroxipatit kromatográfia (CHT)	34
3.8. Antisérum készítés és Western hibridizáció	34
3.8.1. Nyulak immunizálása	34
3.8.2. Indirekt ELISA	34
3.8.3. IgG frakció tisztítás	35
3.8.4. Western blot, hibridizáció és detektálás	35
3.9. Sejtfrakciók készítése	36
3.10. Enzimaktivitás mérés	37
3.10.1. Hidrogén felvevő aktivitás mérése	37
3.10.2. Hidrogén fejlesztő aktivitás mérése	37
3.10.3. Hidrogén felvevő aktivitás detektálása natív poliakrilamid gélben	37
3.10.4. Formát-dehidrogenáz aktivitás mérés	38
3.10.5. Formát-hajtott hidrogenáz aktivitás mérés	38
3.11. Bioinformatikai módszerek	38
3.12. Accession numbers	38
4. Eredmények és tárgyalásuk	41
4.1. A hidrogenázok érésében szerepet játszó gének vizsgálata <i>T. litoralis</i>-ban	41
4.1.1. A <i>hypCD</i> géneket tartalmazó genomi régió izolálása <i>T. litoralis</i> -ból	41
4.1.2. A <i>hypC</i> és <i>hypD</i> géntermékek jellemzése	44
4.1.3. A transzkripció iniciációs hely, a transzkripcióhoz szükséges elemek	44
4.1.4. A <i>hypC</i> és <i>hypD</i> gének transzlációja	45
4.1.5. A <i>hypC</i> és <i>hypD</i> gének funkcionális vizsgálata heterológ gazdában	46
4.2. Membrán kötött hidrogenáz vizsgálata <i>T. litoralis</i>-ban	48
4.2.1. A membrán kötött hidrogenázt kódoló genom régió izolálása <i>T. litoralis</i> -ból	48
4.2.2. Az <i>fhl</i> operon	49
4.2.3. A <i>fhl</i> gének termékeinek részletes leírása	51
4.2.4. Az <i>fhl</i> gének expressziójának transzkripció szintű vizsgálata különböző növesztési körülmények között	54
4.2.5. A komplex sejtbeli lokalizációjának vizsgálata	57
4.2.6. Enzim aktivitás mérés <i>T. litoralis</i> membrán és szolubilis frakciókkal	58
4.2.7. Hidrogenáz aktivitás detektálás natív poliakrilamid gélben	59
4.2.8. A komplex tisztítása	59

<u>4.3. Eredmények tárgyalása</u>	61
<u>5. Hivatkozások jegyzéke</u>	64
<u>6. Saját közlemények jegyzéke</u>	77
<u>6.1. A dolgozat témájához kapcsolódó közlemények</u>	77
<u>6.2. További közlemények</u>	78
<u>Köszönetnyilvánítás</u>	79
<u>Összefoglalás</u>	80
<u>Summary</u>	82

Rövidítések jegyzéke

AMP: adenzin-monofoszfát
ATP: adenzin-trifoszfát
bp: bázispár
BSA: marha szérum albumin
cDNS: komplementer DNS
CTAB: cetil-N,N,N-trimetil-ammónium bromid
DCPIP: diklórfenol-indolfenol
DIG: digoxigenin
dNPP: dinitro-fenil-foszfát
DNS: dezoxi-ribonukleinsav
EDTA: etiléndiamin-tetraecetsav
ELISA: Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
EPR: elektron paramágneses rezonancia spektroszkópia
FMN: flavin-mononukleotid
FTIR: Fourier transzformációs infravörös spektroszkópia
g: nehézségi gyorsulás
GTP: guanozin-trifoszfát
IgG: immunoglobulin G
IPTG: izopropil- β -D-tiogalaktozid
kb: kilobázis
kDa: kiloDalton
NAD: nikotinamid-adenin-dinukleotid
NADP: nikotinamid-adenin-dinukleotid foszfát
NBT: 4-Nitro Blue tetrazólium-klorid
OD: optikai denzitás
orf: nyitott leolvasási keret
PCR: polimeráz láncreakció
PMS: fenazin-metoszulfát
psi: pounds per square inch
RBS: riboszómális kötőhely
RNS: ribonukleinsav
rRNS: riboszómális RNS
rpm: fordulatszám / perc
SDS: nátrium-dodecil-szulfát
Tris: Tris-(hidroximetil)-metilamin
TTK: 2,3,5-trifenil-tetrazólium-klorid

Bevezetés

Fejlett civilizációnk - technikai vívmányainak köszönhetően - hatalmas energiaigénnyel bír. Bár elsődleges energiaforrásunk a Nap, a belőle származó energiát nagyon ritkán hasznosítjuk közvetlenül. Az általunk használt fosszilis energiahordozók elégetésekor tulajdonképpen azt a napenergiát szabadítjuk fel, amely évmilliókkal ezelőtt kötődött meg kémiai energia formájában a fotoszintézis folyamata során.

Ezen anyagok elégetésével azonban nagy mennyiségű széndioxid kerül a légkörbe, ami nagymértékben hozzájárul az üvegházhatás kialakulásához, és az időről időre előforduló kőolajszennyezések is súlyos környezetvédelmi aggályokat vetnek fel. További probléma forrása, hogy a fosszilis energiahordozókat sokkal nagyobb ütemben használjuk fel, mint amilyen ütemben azok keletkeznek.

A kőolaj és földgáz készletek rohamos fogyásával egyre nagyobb figyelem összpontosul az ún. alternatív, megújuló energiaforrásokra, energiahordozókra. Az ilyen megújuló forrásokból, mint pl. a nap, a szél, a víz energiája vagy a biomassza felhasználásával nyert energia óriási mennyiségben áll rendelkezésre, azonban ezek kiaknázása még nem igazán gazdaságos, ezért a hatékonyságot/gazdaságosságot javító kutatások száma egyre növekszik.

Az alternatív üzemanyagok közül az egyik legígéretesebb a hidrogén, mely tárolható, egyszerűen szállítható, és égése során a környezetet nem szennyező víz keletkezik. Ha a hidrogént vízbontással állítjuk elő, akkor folyamat ciklussá zárható, amelyben a kiindulási anyag is és a végtermék is víz, miközben energiát alakítunk át. Egyaránt léteznek természetes (aerob fotoszintézis) és mesterséges rendszerek is a víz bontására.

Számos mikroorganizmus képes hidrogén fejlesztésére hidrogenáz enzimei segítségével. A természetben nem elsődleges cél a hidrogén előállítás, de az evolúció során kialakult folyamatokat a modern biotechnológia segítségével saját hasznunkra fordíthatjuk. A hidrogén termelés egy módja lehet olyan mikroorganizmusok létrehozása, melyek nagy mennyiségű hidrogént termelnek a víz közvetlen biofotolízisével. Egy másik – a fényenergiát közvetve hasznosító – lehetőség a szerves hulladékok anaerob fermentációja. Alternatív megközelésként a sejtből izolált enzim is felhasználható különböző hidrogénfejlesztő rendszerekben (pl. enzim elektródok) (Cammack és mts., 2001).

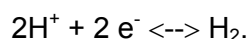
Ahhoz, hogy képesek legyünk mikroorganizmusokkal, vagy a belőlük izolált enzimekkel folyamatosan, nagy mennyiségű hidrogént előállítani, szükséges, hogy megértsük, hogyan működik a hidrogén metabolizmus ezekben az élőlényekben.

1. Irodalmi áttekintés

1.1. A hidrogenázok jellemzése

1.1.1. A hidrogenázok által katalizált reakció és fiziológiás szerepük

A hidrogenázok metalloproteinek, melyek megtalálhatók a mikroorganizmusok igen széles körében és a létező legegyszerűbb reakciót katalizálják:



A folyamat minden esetben egy másik redox rendszerrel kapcsolt pl. oxidált citokróm/redukált citokróm, NAD/NADH, NADP/NADPH stb. és ily módon a reakció iránya a redox reakciópartnerek aktuális redoxpotenciáljától függ. Elektron akceptor jelenlétében az enzim hidrogént oxidál, míg elektron donorral kölcsönhatva hidrogént fejleszt. Fiziológiás körülmények között az egyes enzimek sokszor csak az egyik irányt preferálják, fiziológiás funkciójuknak megfelelően. Egyes hidrogenázok hidrogénfelvevőként viselkednek, így biztosítva redukáló erőt a sejtek számára, míg mások protonok redukálásával hidrogént fejlesztenek, és lehetővé teszik az anaerob lebontási folyamatokból származó redukáló erő eltávolítását.

Emellett bizonyos hidrogenázok hidrogén szenzorként működnek, és a génexpresszió szabályozás fontos elemei. Mások membrán kötötten helyezkednek el és közvetlenül kapcsolódnak a membránok redox/bioenergetikai folyamataihoz. Számos hidrogénfejlesztő hidrogenáz a membrán kapcsolt energia-tárolásban is részt vesz transzmembrán elektrokémiai potenciál különbség kialakítása révén (Vignais és Colbeau, 2004).

1.1.2. A hidrogenázok felosztása

Az ismert hidrogenázok többsége vas-kén fehérje két fématommal az aktív centrumban, vagy egy nikkellel és egy vassal ([NiFe] hidrogenázok) (Volbeda és mts., 1995), vagy két vassal ([FeFe] hidrogenázok) (Peters és mts., 1998). A [FeFe] hidrogenázok általában monomerek, és elsősorban a hidrogén fejlődést katalizálják, míg a [NiFe] hidrogenázok legalább két alegységből állnak, és ugyan kisebb aktivitást mutatnak, de nagyobb hidrogén affinitással rendelkeznek, mint a [FeFe] hidrogenázok, és általában a hidrogén bontásban játszanak szerepet. Korábban egyes metanogén archaebaktériumokban találtak olyan

hidrogenázokat, melyek nem tartalmaztak sem [FeS] klasztert, sem nikkelt, ezért sokáig “fém-mentes” hidrogenázoknak hívták őket (Zirngibl és mts., 1992), de az újabb kutatások szerint aktivitásuk egy vastartalmú kofaktortól függ, tehát helyesebb a “[FeS] klaszter mentes” hidrogenáz elnevezés (Lyon és mts., 2004). A szekvencia és struktúrális vizsgálatok azt mutatják, hogy a fent említett három csoportba tartozó enzimek filogenetikailag eltérő fehérje csoportokat képviselnek (Vignais és mts., 2001).

1.1.2.1. A [NiFe] hidrogenázok

A legtöbb [NiFe] hidrogenázt baktériumokból izolálták, de egyre több archaeobakteriális eredetű enzim válik ismertté (Vignais és mts., 2001). Az enzim katalitikusan fontos magja egy α és egy β alegységből álló heterodimer. A kb. 60 kDa méretű nagy alegység (α) tartalmazza a kétfématomos [NiFe] aktív centrumot, melyet két konzervált CxxC motívum koordinál: egy a polipeptid C-, egy az N-terminálisán. A fehérje belsejében mélyen elhelyezkedő aktív centrumban három kétatomos nem-fehérje ligand – egy CO és két CN^- – is azonosítható infravörös spektroszkópia segítségével, melyek a vashoz kötődnek (Albracht, 1994; Volbeda és mts., 1996).

A kis alegység (β) mintegy 30 kDa-os méretű és jellegzetes $\text{CxxCx}_n\text{GxCxxxGx}_m\text{GCPP}$ ($n=61-106$, $m=24-61$) aminosav szekvencia mintázattal bír, mely egy [4Fe-4S] klasztert köt (Albracht, 1994). A klaszter 14 Å távolságra van az aktív centrumtól, ezért hívják proximális klaszternek (Volbeda és mts., 1995). Ezzel együtt a kis alegység akár három [FeS] klasztert tartalmazhat, melyek az elektronokat vezetik a fiziológiás elektron donor (vagy elektron akceptor) és az aktív centrum közt, melyet hidrofób csatornák kötnek össze a molekula felszínével (Montet és mts., 1997).

A kis és nagy alegység szekvencia analízise alapján a [NiFe] hidrogenázokat négy csoportba sorolják, mely jól egybevetethető az enzimek fiziológiás funkciójával (Vignais és mts., 2001).

A hidrogén felvevő [NiFe] hidrogenázok (1-es csoport)

Ebbe a csoportba tartoznak a membrán kötött respirációs enzimek, melyek segítségével a sejt képes a hidrogént energiaforrásként hasznosítani, a hidrogén oxidációját anaerob elektron akceptorok, úgymint NO_3^- , SO_4^- , fumarát, CO_2 (anaerob légzés) vagy oxigén (aerob légzés) redukációjához kapcsolva. A folyamatok közös lépésében a hidrogénből nyert elektronok a kinon raktárba kerülnek, amelyhez a különféle respirációs láncok is kapcsolódnak. A redukált kinonokról az elektronok a terminális elektron

akceptorokra kerülnek miközben a sejtek az energiát transzmembrán elektrokémiai potenciál különbség formájában tárolják. A membránkötött hidrogenázok a respirációs lánc kinon raktárához egy harmadik alegységük, egy dihem citokróm-*b* segítségével kapcsolódnak, amely a kis alegység hidrofób C-terminálisán keresztül horgonyozza le őket a membránhoz (Vignais és mts., 2004).

A felvevő hidrogenázok egy másik típusát képviselik a *Desulfovibrio* fajok periplazmatikus enzimeit, melyek képesek kölcsönhatásba lépni alacsony redox potenciálú c-típusú citokrómokkal, és egy a *hmc* operon által kódolt transzmembrán redox fehérje komplexszel, így módon részt véve transzmembrán elektrokémiai potenciál grádiens kialakításában (Rossi és mts., 1993).

Ezekre a felvevő hidrogenázokra jellemző a kis alegység N-terminálisán található hosszú szignálpeptid (30-50 aminosav), amely tartalmaz egy konzervált (S/T)RRxFxK motívumot. A szignált a Tat (twin-arginin translocation) útvonalban szerepet játszó fehérjék ismerik fel, mely a végleges szerkezetét teljesen elnyert enzimet szállítja a membránhoz, majd ki a periplazmába (Sargent és mts., 2002).

A citoplazmatikus H₂ szenzorok és a cianobaktériumok hidrogén felvevő [NiFe] hidrogenázai (2-es csoport)

Az ebbe a csoportba tartozó hidrogenázok kis alegysége nem tartalmaz szignálpeptidet, így nem kerülnek ki a citoplazmából. A csoport két jól ismert képviselője a *Rhodobacter capsulatus* HupUV (Vignais és mts., 2000), és a *Ralstonia eutropha* HoxBC (Kleihues és mts., 2000) hidrogenázai. Ezeknek az enzimeknek a feladata a hidrogén észlelése a környezetben, és egy olyan celluláris válasz elindítása, melynek eredményeképpen a hidrogént felvevő (hydrogen uptake (Hup)) [NiFe] hidrogenázok képződnek.

Szintén e csoport tagjai a *Nostoc* (Oxelfelt és mts., 1998) és *Anabaena* (Happe T. és mts., 2000) cianobaktérium fajok ún. felvevő hidrogenázai (HupSL). Ezek az enzimek N₂ fixáló körülmények között indukálódnak és a citoplazma illetve a tilakoid membrán citoplazma felőli oldalán helyezkednek el (Tamagnini és mts., 2002).

A kétirányú, heteromultimer, citoplazmatikus [NiFe] hidrogenázok (3-as csoport)

A kétirányú hidrogenázok különböző alegységekkel egészülnek ki, melyek vízőldékony kofaktorokat kötnek, mint pl. a kofaktor 420, NAD vagy NADP. Nevüket onnan

kapták, hogy képesek reverzibilisen működni, és a körülményektől függően képesek oxidálni vagy redukálni a kofaktorokat.

A csoport sok tagja található meg archaebaktériumokban, ide tartoznak a trimer F_{420} redukáló hidrogenázok, valamint a hipertermofil mikrobák négy alegységes enzimeit, amelyek a protonok mellett *in vitro* képesek az elemi kén is kén-hidrogénné redukálni, és NADPH-t használnak elektron donorként (Ma és mts., 1994a).

Az első NAD-függő tetramer [NiFe] hidrogenázt *R. eutropha*-ban találták meg (Schneider és Schlegel, 1976). Ezek az enzimek két részből állnak, a heterodimer [NiFe] hidrogenáz részből, melyeket a *hoxY* és *hoxH* gének kódolnak, és egy a *hoxU* és *hoxF* gének által kódolt diaforáz részből, ami homológiát mutat a mitokondriális komplex I és bakteriális légzési láncok egyes alegységeivel, és NAD(P), FMN valamint [FeS] kötő helyeket tartalmaz (Vignais és mts., 2001, 2004). Mostanában sikerült egy újabb alegység jelenlétét kimutatni, e kutatások szerint az enzim öt különböző alegységből felépülő heterohexamer: HoxFUYHI₂ (Burgdorf és mts., 2005). Cianobaktériumokban, és *Thiocapsa roseopersicina*-ban viszont egy teljesen más típusú ötödik alegységet találtak, melyet a *hoxE* gén kódol (Tamagnini és mts., 2002, Rákhely és mts., 2004).

Hidrogén fejlesztő, energia konzerváló, membránkötött hidrogenázok (4-es csoport)

Ebbe a csoportba multimer (hat vagy több alegység), membránhoz kötött enzimek tartoznak. Az alegységek közül legalább négy hidrofíli és kettő integráns membrán fehérje. Ez a hat konzervált alegység alkotja az ide tartozó hidrogenázok gerincét. A csoport hidrogenázait felépítő alegységek meglepően alacsony szekvencia hasonlóságot mutatnak más [NiFe] hidrogenázok megfelelő alegységeivel, ellenben nagyfokú hasonlóság található köztük és a bakteriális komplex I-et (energia konzerváló NADH:ubikinon oxidoreduktáz) alkotó fehérjék között (Hedderich, 2004).

A hasonlóság ellenére a komplex I és ezen hidrogenázok által katalizált reakciók igen különbözőek. Egy részük protont redukál ferredoxinról, vagy poliferreredoxinról származó elektronokkal, más részük az ellentétes irányban működve hidrogén bontásával biztosítja a sejtek számára a redukált ferredoxint. Mint ahogy a komplex I, ezek a hidrogenázok is képesek ionokat pumpálni a membránon át, ezért kapták az energia konzerváló elnevezést (Hedderich, 2004).

Mind a komplex I, mind az energia konzerváló hidrogenázok tartalmaznak egy állandó modult, amely az exergonikus redox reakciót összekapcsolja a kationok (H^+ vagy Na^+) membránon keresztüli elektrogén transzlokációjával (Friedrich és Scheide, 2000). Az ezeket a hidrogenázokat tartalmazó organizmusok igen ősi metabolizmussal rendelkeznek (pl. CO-n

növekedés anaerob körülmények közt), ezért azt feltételezik, hogy ezek az ionpumpák először ezekben az élőlényekben jelentek meg. Komplex I ezekből a hidrogenázokból fejlődhetett ki, alternatív redox domének és további membrán alegységek hozzáadásával, valamint a [NiFe] centrum kinon kötőhelyé alakulásával (Friedrich és Weiss, 1997; Hedderich, 2004).

A csoport prototípusa az *E. coli* 3-as hidrogenáza (H_2 áz-3), melyet a *hyc* operon kódol, és formát-dehidrogenáz H-val (FdhH) együtt alkotja a formát hidrogénliáz komplexet (FHL-1) (Böhm és mts., 1990). A komplex működése által az *E. coli* fermentatív növekedése során formátból H_2 és CO_2 keletkezik (Sawers, 2005). Ez az útvonal alacsony pH és magas formát koncentráció esetén aktív, feladata a formát bontásával a tápközeg túlzott lesavanyodásának a megakadályozása.

Egy másik lókuszon a *hyf* operon által kódolt az *E. coli* tíz alegységes 4-es hidrogenáz komplexe (H_2 áz-4). A tíz génből hét (*hyfABCGHIJ*) a H_2 áz-3 hét alegységével homológ fehérjéket kódol. A további három gén (*hyfD*, *hyfE* és *hyfF*), amelyeknek nincs megfelelője a *hyc* operonban, integráns membrán fehérjéket kódol, melyekből kettő a NADH:kinon oxidoreduktáz (komplex I) azon alegységeivel mutat hasonlóságot, melyek fontos szerepet játszanak az energia konzerválással kapcsolt proton transzlokációban. Az első feltételezések szerint a *hyf* operon egy új hidrogenáz komplexet kódol, mely egy formát-dehidrogenázzal együtt egy második formát hidrogénliázot alkot (Andrews és mts., 1997). Később kimutatták, hogy míg enyhén savas pH-n (pH=6,5) a hidrogén produkcióért valóban H_2 áz-3 és Fdh-H felelős, addig enyhén lúgos (pH=7,5) körülmények között H_2 áz-4 látja el ezt a feladatot, szintén a Fdh-H-hoz kapcsolódva. A folyamat F_0F_1 -ATPáz függő. A H_2 áz-4 és Fdh-H által alkotott FHL-2 komplexet az F_0F_1 -ATPáz által létrehozott protongradiens hajtja, fiziológiai szerepe azonban nem tisztázott (Bagramyan és mts., 2002).

A *Rhodospirillum rubrum* CO indukált hidrogenáza szintén e csoport tagja. Az enzim a CO oxidáló rendszer része, és képessé teszi a mikroorganizmust a sötétben való növekedésre, melynek során CO-ot használ fő energiaforrásként. A *coo* operon által kódolt CO-dehidrogenáz és a hidrogenáz CO-ot oxidál CO_2 -dá, miközben hidrogén fejlődik. (Fox és mts., 1996).

A csoportba tartozó enzimek nagy részét archaebaktériumokból izolálták vagy olyan organizmusokból, melyeket az extrémofil élőlények csoportjába sorolunk. Ide tartoznak a *Methanosarcina barkeri* (Kunkel és mts., 1998), egyes *Methanothermobacter* fajok (Tersteegen és Hedderich, 1999) és a *Pyrococcus furiosus* (Sapra és mts., 2000, Silva és mts., 2000) bizonyos hidrogenázai.

Az acetáton növesztett metanogén archaebaktérium, *M. barkeri* membrán kötött [NiFe] hidrogenáza az acetát karbonil csoportjának CO_2 -dá oxidálása során keletkező

redukált ferredoxint felhasználva fejleszt hidrogént energia konzerváló mechanizmus révén (Meuer és mts., 1999). Az *echABCDEF* operon által kódolt enzim hat alegységből áll.

Ezeket a hidrogenázokat olyan mikroorganizmusokban is megtalálták, amelyekről eddig azt feltételezték, hogy tisztán fermentatív metabolizmussal rendelkeznek. A hipertermofil archaebaktérium *P. furiosus* a két citoplazmatikus 3-as típusú hidrogenáza (Pedroni és mts., 1995, Ma és mts., 2000) mellett tartalmaz egy membrán kötött hidrogenázt (Mbh) is, melyet egy 14 génből álló operon (*mbhA-N*) kódol (Schut és mts., 2001). A gének által kódolt fehérjék közül szekvencia analízis alapján hat megfeleltethető a *M. barkeri* Ech hidrogenáz, a *R. rubrum* CO-indukált hidrogenáz, és az *E. coli* H₂áz-3 konzervált alegységeinek, a további nyolc gén kis méretű membrán fehérjét kódol. Ez az elrendezés emlékeztet a *Methanothermobacter thermoautotrophicus* és *M. marburgensis* *eha* és *ehb* génklasztereire, ahol az energia konzerváló hidrogenázokra jellemző alegységeket kódoló gének mellett 9-10 nem konzervált, kis méretű, integráns membrán fehérjét kódoló géneket találtak (Tersteegen és Hedderich, 1999).

Ezek a multimer membrán kötött hidrogenáz komplexek a komplex I proton pumpálásban, és energia csatolásban szerepet játszó alegységeivel homológ transzmembrán alegységekkel bírnak, és képesek az acetátból, formátból vagy szénmonoxidból származó karbonil csoport oxidációját protonok hidrogénné való redukálásához kapcsolni (Hedderich, 2004). A *P. furiosus* Mbh esetében kimutatták, hogy képes a redukált ferredoxinról történő elektron transzfert mind proton redukcióhoz, mind proton transzlokációhoz kapcsolni, azaz a hidrogén fejlesztést ATP szintézishez kapcsolni (Sapra és mts., 2003). Ez megmagyarázza azt is, miért található *P. furiosus*-ban egy nem szokványos, NAD⁺ helyett ferredoxint használó glikolitikus útvonal.

1.1.2.2. A [FeFe] hidrogenázok

Ellentétben a [NiFe] hidrogenázokkal, melyek legalább két alegységből állnak, sok [FeFe] hidrogenáz monomer, bár di-, tri- és tetramer is található köztük (Vignais és mts., 2001). A katalitikus alegység igen nagy méretbeli variabilitást mutat, egy kb. 350 aminosavból álló az aktív centrumot, az ún. H-klasztert is magába foglaló konzervált doménen kívül gyakran tartalmaz további doméneket, melyek [FeS] klasztereket hordoznak (Adams, 1990). A H-klaszter egy binukleáris [FeFe] centrumból áll, mely egy ciszteinen át kapcsolódik egy [4Fe-4S] klaszterhez, és négy ciszteinen át a fehérjéhez. Nem fehérje ligandok, mint a CN⁻ és CO, mindkét Fe atomhoz kötődnek. Itt is megtalálhatók a hidrofób csatornák, melyek összekötik a fehérje belsejében lévő aktív centrumot a felszínnel (Peters és mts., 1998; Nicolet és mts., 1999).

A [FeFe] hidrogenázok, különösen az aktív centrum felépítése meglehetősen eltér a [NiFe] hidrogenázokétól, nem meglepő tehát, hogy egészen más érési útvonallal rendelkeznek. Érésük kevésbé felderített a [NiFe] hidrogenázokénál, *Chlamidomonas reinhardtii*-ből izolálták a *hydEFG* géneket, melyek termékei szükségesek a H-klaszter kialakításához (Posewitz és mts., 2004).

A [FeFe] hidrogenázok főként anaerob prokariótákban, mint pl. *Clostridium* fajokban vagy szulfát redukáló mikroorganizmusokban (Vignais és mts., 2001), valamint eukariótákban, elsősorban algákban találhatók (Horner, és mts., 2000, 2002; Happe és mts., 2002). Ez az egyetlen hidrogenáz csoport, melynek képviselői előfordulnak eukariótákban és kizárólag membránnal határolt organellekben, kloroplasztisban vagy hidrogenozómákban helyezkednek el. A [FeFe] hidrogenázok főként hidrogén fejlesztésben játszanak szerepet, de ismertek hidrogén felvevő képviselőik is, mint pl. a *Desulfovibrio vulgaris* periplazmatikus hidrogenáza (Pohorelic és mts., 2002).

1.1.2.3. A [FeS] klaszter mentes hidrogenázok, Hmd

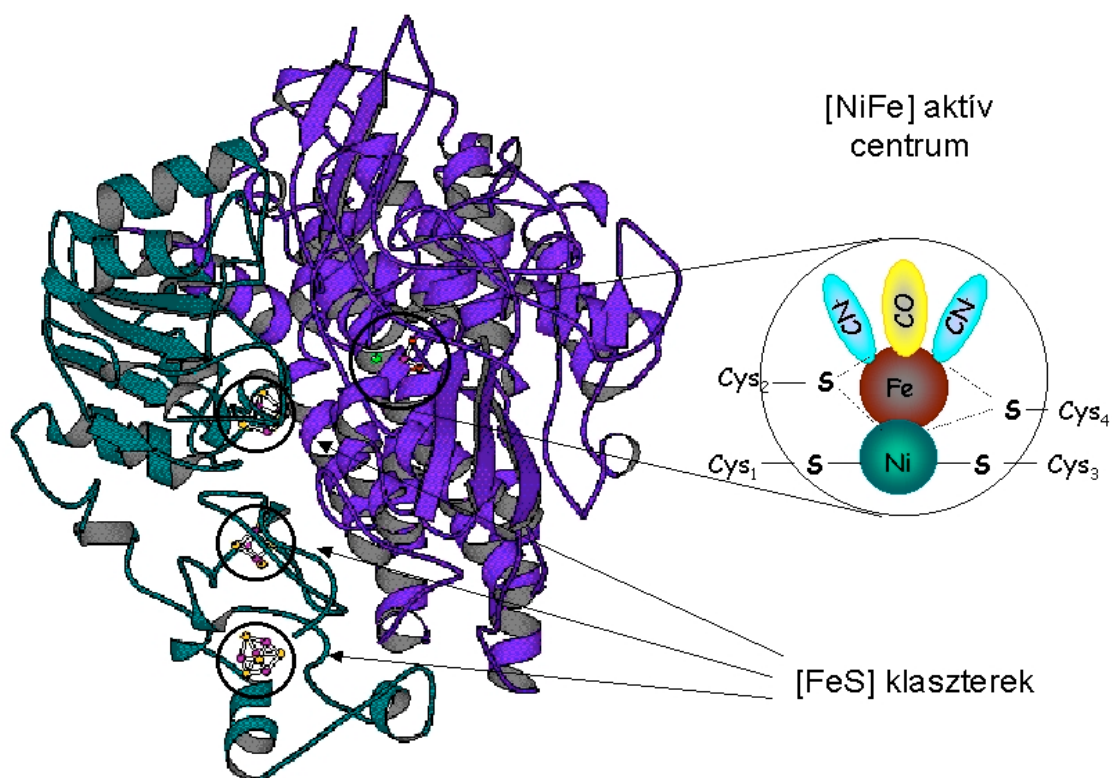
Ezek a hidrogenázok metanogén archaebaktériumokban találhatók, és Hmd betűkkel jelölik őket, ami a H₂-forming methylenetetrahydromethanopterine dehydrogenases elnevezés rövidítése (Thauer és mts., 1996). Az enzim nem tartalmaz sem nikkelt sem [FeS] klasztert, és nikkel limitált körülmények között nevelt sejtekben indukálódik (Zirngibl és mts., 1992; Afting és mts., 1998). Két azonos kb. 40 kDa-os alegységből áll, és az *N*⁵,*N*¹⁰-metenil-tetrahidromethanopterin hidrogén függő redukcióját katalizálja metilén-tetrahidromethanopterinné és protonná. A reakció reverzibilis. Nem katalizálják sem a hidrogenáz aktivitás mérésre általánosan használt festékek (metilviologén, metilénkék) redukcióját, sem hidrogén izotópok proton kicserélését, de ami a legfontosabb, nem katalizálják a $2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightleftharpoons \text{H}_2$ reverzibilis reakciót sem.

A fehérje egy kofaktort köt és mind a fehérje mind a kofaktor fényérzékeny (Buurman és mts., 2000). A sötétben tisztított Hmd monomerenként egy vasat tartalmaz, amely fényinaktiváláskor kiszabadul az izolált kofaktorból és az enzimből, ezért tartották indokoltnak, hogy az eddigi fém mentes hidrogenáz elnevezést [FeS] klaszter mentes hidrogenáz elnevezésre módosítsák (Lyon és mts., 2004).

1.2. A [NiFe] hidrogenázok szerkezete, működése, bioszintézise

1.2.1. Az aktív centrum és a reakció molekuláris mechanizmusa

A számos *Desulfovibrio* fajból izolált [NiFe] hidrogenáz röntgen krisztallográfiás vizsgálatával sikerült jellemezni e fehérjék egyedülálló kétatomos aktív centrumát (Volbeda és mts., 1995, 1996, 2002; Higuchi és mts., 1997, 1999). Az itt található nikkel atomot négy cisztein oldallánc koordinálja, amelyből kettő a vas atommal is hidat képez (1.1. ábra). Az aerob tisztított enzim inaktív formájában van egy további μ -oxo vagy hidroxó csoport, ami a nikkel és vas atom közt képez hidat (Garcin és mts., 1999; Higuchi és mts., 1999; Volbeda és mts., 2002). A vasatomhoz nem-fehérje természetű kétatomos ligandok kötődnek, nevezetesen két CN^- és egy CO molekula (Volbeda és mts., 1996).



1.1. ábra A *Desulfovibrio gigas* [NiFe] hidrogenázának kristályszerkezete. A kinagyított részben a nagy alegységben található aktív centrum látható.

Annak ellenére, hogy a [NiFe] és [FeFe] hidrogenázok struktúráisan nagy mértékben eltérnek és evolúciósan sem rokonok, rendelkeznek közös vonásokkal, például mindkét csoportban megtalálhatók a vashoz kötődő CO és CN^- ligandok az aktív centrumban. Ezen ligandok jelenléte alacsony oxidációs és spin állapotban stabilizálja a vas atomot, és az

átmeneti fémekre (Ru, Pd, Pt) jellemző tulajdonságokkal ruházzák fel, amelyek közismerten a hidrogén bontás jó katalizátorai (Adams és Stiefel, 2000). Egy másik közös vonás a kétatomos fém centrumhoz közeli [FeS] klaszter jelenléte, mely további [FeS] klasztereken keresztül kapcsolatban áll a fehérje felszínnel, ahol az elektron donorról/akceptorra való elektroncsere történik. Végül, mindkét enzim csoport tartalmaz hidrofób gázcsatornákat.

Különböző biofizikai módszerekkel (Mössbauer spektroszkópia, EPR, FTIR) azonosítani lehet azokat az intermediereket, amelyek a hidrogenáz enzim különböző katalitikus állapotainak felelnek meg (Albracht, 1994, 2001). Az oxidált aerob állapotban a legtöbb [NiFe] hidrogenáz inaktív, a nikkell és vas atom között létrejövő áthidaló ún. oxo ligand jelenléte miatt. Reduktív aktiváció során a ligand vízzé redukálódik és a nikkell Ni^{3+} állapotból a Ni^{2+} állapotba megy át. Az enzim aktív állapotban ($\text{Ni}_a\text{-S}$) képes hidrogént kötni és Ni-R állapotba kerülni. A katalitikus ciklus következő lépése a molekuláris hidrogén heterolitikus bontása a fémcentrumban. A Ni-R egy elektron leadásával oxidálódik, így Ni-C állapotba megy át, amelyben a [NiFe] centrum egy hidridet köt. A centrum további egy-elektronos oxidációját követően protonok távoznak a centrumról és a Ni-S (Ni^{2+}) állapot regenerálódik. Az elektron a proximális [4Fe-4S] klaszterre jut, ahonnan a felszínhez közeli disztális [4Fe-4S] klaszterre, majd onnan az elektron akceptorra kerül.

1.2.2. A nagy alegység érése

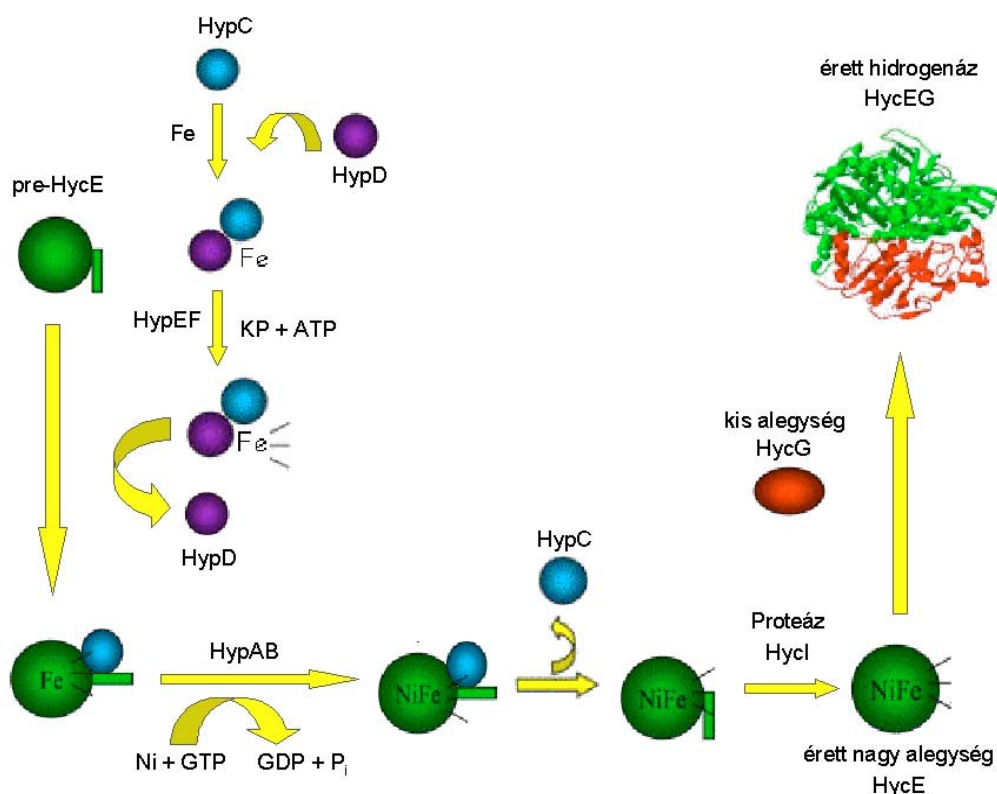
A hidrogenázok érése igen komplex folyamat, melyben legalább hét kisegítő fehérje, a *hyp* gének termékei, név szerint a HypA, HypB, HypC, HypD, HypE, HypF fehérjék és egy endopeptidáz vesz részt. Irányítják a fémcentrum szintézisét, és annak a fehérjébe történő beépülését, ehhez megfelelő konformációban tartják a polipeptid láncot, majd a centrum beillesztése után segítik a végső struktúra elérését (Jacobi és mts., 1992; Casalo és Roussel, 2001). A legjobban ismert és így a hidrogenáz érés prototípusának tekintett rendszer, az *E. coli* 3-as hidrogenázának alább leírt bioszintézise.

A folyamat a nagy alegység prekursorának (pre-HycE) szintézisével indul, amely az érett fehérjéhez képest egy C-terminális extenzióval rendelkezik. Ez még nem tartalmaz semmilyen fémot, a katalitikus centrum poszttranszlációs összeszerelését a HypA-F fehérjék végzik. Első lépésként a HypD fehérje megköt egy vasatomot és kölcsönhatásba lép a HypC fehérjével. A ligandok beépülése a HypC-HypD komplexen történik. A CN^- ligand (és valószínűleg a CO) beépítéséért a HypF és HypE fehérjék felelősek (Reismann és mts., 2003). A HypF fehérje szubsztátja a karbamoil-foszfát (KP), működése során ATP-t hidrolizál AMP-vé és inorganikus pirofoszfáttá, melynek eredményeképpen egy adenilált KP származék keletkezik (Paschos és mts., 2002). Azt, hogy a KP szükséges a fémcentrum

szintéziséhez, KP szintetáz mutánsok vizsgálatával bizonyítottak, melyek képtelenek aktív [NiFe] hidrogenázok szintézisére (Paschos és mts., 2001). A KP foszfát csoportja a HypF karbamoil foszfátáz aktivitása révén lehasad, a karbamoil csoport pedig a HypE C-terminálisán lévő cisztein oldalláncra kerül. A fehérje karbamoilációját a karbamoil ATP-függő dehidrációja követi, melynek eredményeképpen egy ciano-HypE jön létre, amelyről a cianocsoport a HypD-n lévő vasra kerül át. A CO ligand eredete és bioszintézise eleddig tisztázatlan (Roseboom és mts., 2005). A HypD-HypC komplexről a komplexben lévő vas a HypC-vel együtt átkerül a pre-HycE-re, miközben HypD leválik (Blokesch és mts., 2002). A HypC komplexet képezve a nagy alegység prekursorával (pre-HycE) chaperonként működve a nikkel beépüléshez megfelelő konformációban tartja azt (Magalon és Böck, 2000 a,b). A HypC fehérjék nem teljesen specifikusak egy hidrogenázra, mind a 3-as H₂áz éréséért felelős HypC, mind HybG, mely a 2-es H₂ázra specifikus chaperon, képes részt venni *E. coli* H₂áz-1 érésében (Blokesch és mts., 2001).

Thiocapsa roseopersicina-ban mutánsokkal végzett vizsgálatok arra utalnak, hogy az egyes HypC fehérjék eltérő funkcióval bírnak. Ez a fotoszintetikus baktérium két *hypC* gént tartalmaz (*hypC*₁ és *hypC*₂), és a baktérium mindhárom ismert hidrogenázának éréséhez szükség van mindkét HypC fehérjére. Az egyik komplexet képez HypD-vel, a másik a hidrogenázok éretlen nagy alegységével. A modell szerint a HypC-HypD komplexről csak a FeCO(CN⁻)₂ kerül át az éretlen nagy alegységre, amely már előzetesen kapcsolódott egy másik HypC molekulával. A modellel az *E. coli*-ra kapott adatok is értelmezhetőek és ezt az elképzelést támasztja alá az is, hogy minden eddig vizsgált [NiFe] hidrogenázt tartalmazó mikroorganizmusban két HypC típusú fehérje génjét találták meg, még akkor is ha csak egy hidrogenázt tartalmazott a sejt (Maróti és mts., 2003).

A nikkel beépülés során a HypA és HypB fehérjék működnek együtt, melynek eredménye egy a NiFe(CO)(CN⁻)₂ centrumot tartalmazó pre-HycE HypC komplex (Olson és mts., 2001). Bebizonyosodott, hogy GTP szükséges a nikkel beépüléshez, a HypB fehérje C-terminálisán pedig található egy konzervált GTP-kötő motívum (Maier és mts., 1995). *E. coli* HypB fehérjéről kimutatták, hogy kölcsönhatásba lép a peptidil-prolil cisz/transz izomeráz SlyD fehérjével, ami egy fémkötő fehérje. A fehérjét kódoló gén inaktiválásával jelentősen csökkent a nikkel felhalmozódás és a hidrogenáz aktivitás a sejtekben (Zhang és mts., 2005). Egyes mikroorganizmusok, mint pl. a *R. capsulatus* vagy az *Azotobacter vinelandii* HypB fehérjéjének N-terminálisán hisztidin gazdag domént figyeltek meg (ez *E. coli* HypB-ben nincs), mely alkalmassá teszi a fehérjét nikkel tárolására (Olson és mts., 1997).



1.2. ábra Az *E. coli* 3-as hidrogenáz érése (Vignais és Colbeau, 2004 alapján). A nagy alegység a szintézis után egy C-terminális extenziót tartalmaz (pre-HycE). A vasat a HypC-HypD komplex hordozza, a nem fehérje természetű ligandokkal együtt, amelyek szintézisében a HypEF fehérjék játszanak szerepet. A vas a ligandjaival együtt a nagy alegységre kerül, miközben HypD leválik. A HypC a nagyalegység prekursorát chaperonként működve a megfelelő konformációban tartja, majd a HypAB fehérjék közreműködésével beépül a nikkel. Ezután kerül sor a HypC leválására és a fehérje C-terminális végének endopeptidáz általi lehasítására.

A HypC chaperon leválása után az *E. coli* 3-as hidrogenáz bioszintézise a pre-HycE C-terminálisának proteolitikus vágásával és a kis és nagy alegység alkotta heterodimer létrejöttével fejeződik be. A proteolitikus hasításhoz a HypC-nek le kell válnia a komplexről, mert csak a HypC mentes nikkelt tartalmazó pre-HycE szubsztrátja a HycI endopeptidáznak (Magalon és Böck, 2000 a,b). A nikkel felismerési szignálként és kötőhelyül szolgál az endopeptidáz számára, ezért HycI csak a nikkel beépülése után képes levágni a pre-HycE C-terminálisát (Theodoratou és mts., 2000). Az egyes hidrogenázok érésében más és más specifikus proteázok vesznek részt, az *E. coli* 2-es hidrogenáz hasításáért pl. a HybD fehérje felelős. A HycI-vel és HybD-vel homológ endopeptidázok a fehérje C-terminálisán található, a CX₂CX₂H/R motívumot követő konzervált His (vagy Arg) után vágunk. A hasítás utáni konformációs változás révén alakul ki a híd a két fém atom és a C-terminálisához legközelebb fekvő cisztein oldallánc között és jön létre a teljes hetero-binukleáris centrum (Magalon és

Böck, 2000b). Ezt követi az érett kis alegység és az érett nagy alegység összeszerelődése, melynek során létrejön a funkcionális heterodimer (1.2. ábra).

Érdekesség, hogy a hidrogén szenzor regulátor hidrogenázok (RH), és egyes a 4-es csoportba tartozó, membrán kötött, energia konzerváló hidrogenázok nagy alegység prekursorai nem tartalmazzák a C-terminális extenziót, így az endopeptidáz fehérjékre ezek érési folyamatában nincs szükség.

1.2.3. A kis alegység [FeS] klasztereinek bioszintézise

A [FeS] klaszterek bioszintézise nem specifikus a hidrogenázokra. A hidrogenázok bioszintézisének vizsgálata vezetett a [FeS] klaszterek összeszereléséért felelős fehérjék megtalálásához (Frazzon és mts., 2002). Ilyenek az *A. vinelandii* NifS és NifU fehérjéi. A NifS egy piridoxál-foszfát függő cisztein-deszulfuráz aktivitással rendelkező homodimer, szubsztrátja az L-cisztein, amellyel az enzim egy ciszteinje cisztein-perszulfidot képez, ez utóbbi a [FeS] klaszterekhez használt kén feltételezett aktivált formája (Zheng és mts., 1993, 1994). NifU egy homodimer, szerepe, hogy molekuláris vázát adja a NifS által vezérelt [FeS] klaszter szintézisnek. NifU N-terminálisán található egy redox-aktív [2Fe-2S] klaszter (permanens klaszter), de emellett egy másik, labilis [2Fe-2S] klaszter is összeszerelődik rajta (tranzienst klaszter) NifS, Fe^{2+} és cisztein jelenlétében. Ez az a klaszter, ami később más fehérjékbe épül.

Mivel a *nifS* és *nifU* gének inaktivációja nem szüntette meg, csak csökkentette a hidrogenáz aktivitást, ezért további, a NifS és NifU fehérjékhez struktúrájában és funkciójában hasonló fehérjéket kódoló géneket kerestek (Zheng és mts., 1998). Az *A. vinelandii*-ben megtalált *isc* (iron-sulfur-cluster formation) génklaszter (*iscRSUA-hscBA-fdx*) széles körben elterjedt a baktériumokban, de homológjaik eukariótákban is megtalálhatók. Az operon által kódolt összes fehérje szerepet játszik a [FeS] klaszterek létrehozásában (Vignais és Colbeau, 2004). Funkcionálisan IscS NifS-nek, míg IscU NifU-nak felel meg.

Tisztázódott tehát, hogy a [FeS] klaszterek szintézise során cisztein-deszulfurázok működnek kén donorként, de sokáig nem tudtak semmit a vas donorról. A legutóbbi közlemények alapján *E. coli*-ban IscA játsza a vas donor szerepét a folyamatban, melyről bebizonyosodott, hogy vaskötő fehérje, és IscS valamint L-cisztein jelenlétében vasat tud adni az IscU tranzienst [FeS] klaszterének összeszereléséhez (Ding és Clark, 2004).

Ezekon kívül még további, a [FeS] klaszterek létrehozásában szerepet játszó géneket azonosítottak *E. coli*-ban, nevezetesen a *sufABCSDE* operont. SufS IscS-hez hasonlóan cisztein-deszulfuráz aktivitást mutat, míg SufA IscA-val mutat szekvencia hasonlóságot.

Fiziológiai és genetikai vizsgálatok azt mutatják, hogy a Suf rendszer vas limitált körülmények közt működik (Vignais és Colbeau, 2004).

1.2.4. Hidrogenáz génklaszterek

A Proteobaktériumokban a H_2 -felvevő hidrogenázokat kódoló gének többnyire csoportokban helyezkednek el. A klaszterek tartalmazzák a struktúrális és a fehérje érésében szerepet játszó fehérjéket kódoló kisegítő géneket valamint a regulációs géneket. A vas-kén kockák kialakításáért felelős gének általában külön régiókban találhatók.

Mivel a hidrogenáz génklaszterek homológ fehérjéket kódolnak, azt feltételezhetjük, hogy a különböző mikroorganizmusokban analóg bioszintetikus mechanizmusok működnek. Bár a hidrogenáz bioszintézisben szerepet játszó fehérjék konzerváltak, vannak olyan fehérjék, amelyek specifikusak a nekik megfelelő struktúrális fehérjékre, mások szelektíven egy családba tartozó hidrogenázok létrejöttéhez szükségesek és vannak olyanok, amelyek a sejt összes hidrogenázának az éréséhez elengedhetetlenek (Maróti és mts., 2004). Ez ad magyarázatot arra, miért nehéz jó eredményeket elérni a heterológ gazdában történő fehérjetermeléssel.

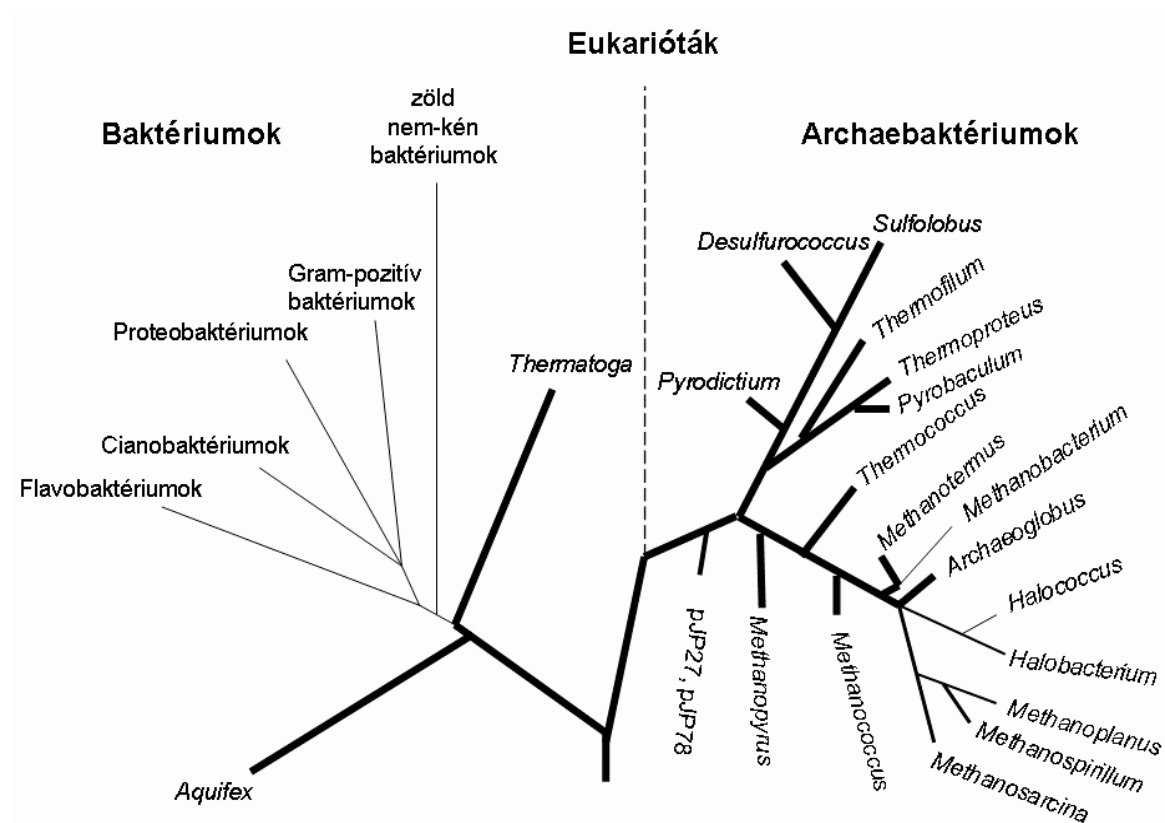
1.3. *Thermococcus litoralis*

1.3.1. Archaeobaktériumok általános jellemzése

Az 1980-as években Woese által végzett 16S rRNS vizsgálatok bebizonyították, hogy az élővilág az addigi kettős felosztással ellentétben három ún. „királyságra” tagolható. Ezek a: Baktériumok (vagy Eubaktériumok), Eukarióták és Archaeonok (vagy Archaeobaktériumok) (Woese és mts., 1990). Az archaeobaktériumok – akárcsak a baktériumok – prokarióták, mégis nagyon sok mindenben különböznek tőlük, bizonyos vonatkozásokban közelebb állnak az eukariótákhoz. Egyrészt az archaeobakteriális promoterek szerkezete, a transzkripció iníciáció apparátusa az eukariótákéval mutat hasonlóságot, másrészt viszont a transzlációs mechanizmus, a riboszómák felépítése a baktériumokéra hasonlít (Soppa, 1999).

Az Archaea doménen belül három csoportot különböztetünk meg. A Crenarchaeota ághoz soroljuk a szélsőségesen termofil mikroorganizmusokat magukba foglaló rendek többségét, mint például a Thermoproteales és Sulfolobales. Az Euryarchaeota ághoz a hipertermofil fajokat magukba foglaló rendek mellett (pl. Thermococcales) metanogén és extrém halofil mikroorganizmusok is tartoznak (1.3. ábra). E két nagy csoport mellett riboszómális RNS vizsgálattal fedeztek fel olyan törzseket, melyek az Archaeobaktériumok

egy harmadik csoportját a Korarchaeota ágat képviselik, egy igen ősi fejlődési vonalat, mely még a Crenarchaeota és Euryarchaeota elágazás előtt vált le (Barns és mts., 1996).

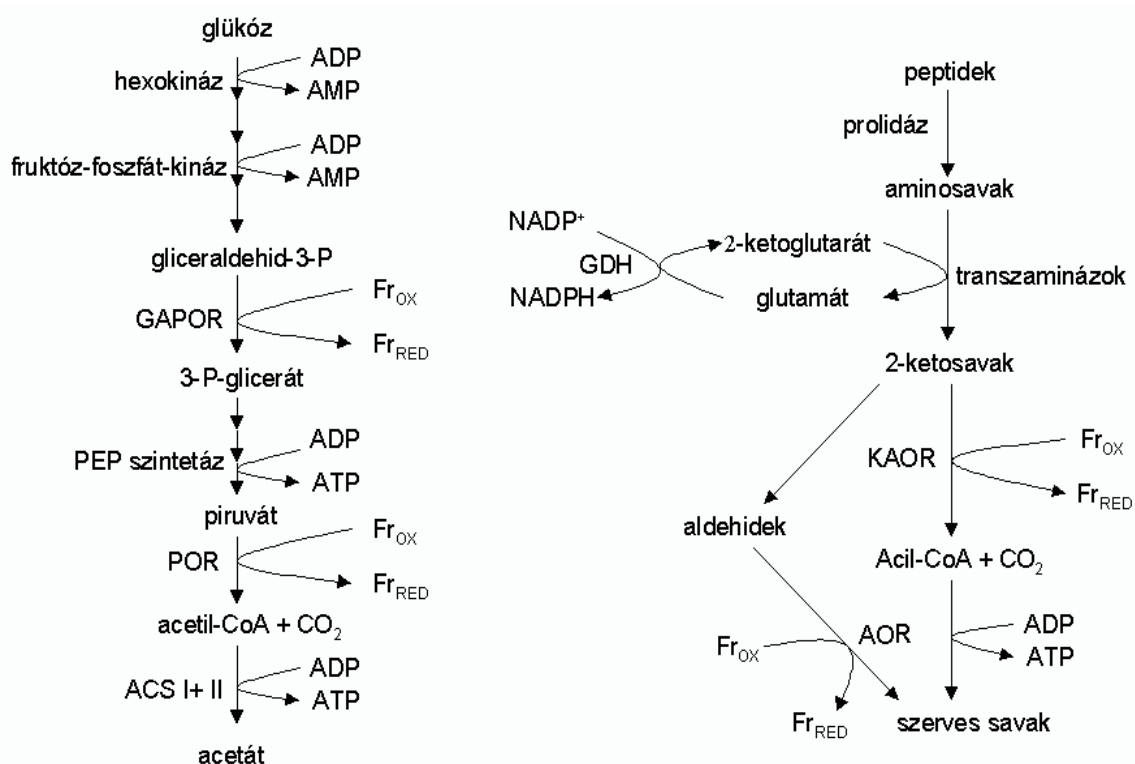


1.3. ábra A hipertermofil mikroorganizmusok a filogenetikai fán. A hipertermofil mikroorganizmusokat tartalmazó fejlődési ágakat vastag vonallal jelöltem.

A *Thermococcus litoralis* a Thermococcales rend *Thermococcaceae* családjának a tagja. A családon belül két genusz található, a *Thermococcus* és a *Pyrococcus*. A rendbe sorolt összes fajt kénben gazdag, anaerob tengeri élőhelyekről izolálták. Mindegyikük termofil, optimális növekedési hőmérsékletük a 75°C-tól a 104°C-ig terjedő tartományban van (Zillig és mts., 1983, 1987).

1.3.2. A *Thermococcaceae* család tagjainak metabolizmusa

A *Thermococcaceae* család tagjai kivétel nélkül anaerob mikroorganizmusok, növekedésük során peptideket, bizonyos esetekben fehérjéket, aminosavakat, ritkábban szénhidrátokat hasznosítanak szénforrásként. A fajok többsége nem képes kén hiányában növekedni, de a nem obligát kén-függőket is jelentős mértékben stimulálja a kén jelenléte, ilyenkor a hidrogén mellett H₂S termelés figyelhető meg (Ma és mts., 1993).



1.4. ábra A feltételezett glikolitikus és peptidolitikus útvonal *P. furiosus*-ban (Adams és mts., 2001 alapján). Rövidítések: ACS: acetil-CoA szintetáz, AOR: aldehid:ferredoxin oxidoreduktáz, GAPOR: gliceraldehyd-3-foszfát:ferredoxin oxidoreduktáz, GDH: glutamát-dehidrogenáz, KAOR: 2-ketosav oxidoreduktázok, PEP: foszfo-enolpiruvát, POR: piruvát:ferredoxin oxidoreduktáz.

A peptid és szénhidrát metabolizmust a *P. furiosus*-ban tanulmányozták a legalaposabban, amely egyfajta heterotróf hipertermofil modellorganizmus. A glikolízis az Embden-Meyerhoff glikolitikus útvonal egy módosított ADP-függő változatán keresztül történik (Kengen, 1996). A folyamatban ADP-függő kinázok vesznek részt, és a glükóz $\Rightarrow$ piruvát átalakulás oxidációs lépéseit ferredoxinnal működő enzimek katalizálják, mint például a gliceraldehyd-3-foszfát:ferredoxin oxidoreduktáz (GAPOR), ami a gliceraldehyd-3-foszfát dehidrogenázt és a foszfo-glicerát kinázt helyettesíti, vagy a piruvát:ferredoxin oxidoreduktáz (POR) (1.4. ábra).

A peptid lebontásból származó aminosavakat transzaminázok alakítják át 2-ketosavakká, amiket a megfelelő oxidoreduktázok alakítanak át koenzimA (CoA) származékokká (1.4. ábra) (Adams és Kletzin, 1996). Mindkét folyamatban az energia szubsztrátszintű foszforiláció során tárolódik. A keletkező koenzimA származékokat az acetil-CoA szintetáz I és II alakítja szerves savakká, miközben ADP-ből ATP keletkezik. A

fermentáció fő végtermékei acetát, H_2 , CO_2 , és peptiden növesztett sejtek esetén szerves savak.

Létezik egy alternatív útvonal az aminosav lebontás során, ami a sejt redox egyensúlyától függ. Ilyenkor a 2-ketosavak aldehidekké dekarboxilálódnak, majd aldehid:ferredoxin oxidoreduktáz által karboxil-savvá oxidálódnak (Adams és mts., 2001).

1.3.3. A *Pyrococcus furiosus* hidrogenázai és a sejt metabolizmusában játszott szerepük

A *Thermococcaceae* család legjobban ismert tagja a *Pyrococcus furiosus*. Eleddig három hidrogenázt azonosítottak *P. furiosus*-ban, két szolubilis (Bryant és Adams, 1989, Ma és mts., 2000), és egy membrán kötött enzimet (Sapra és mts., 2000).

Mindkét *P. furiosus* szolubilis hidrogenáz (szulfhidrogenázI és II) négy alegységből áll, ebből két alegység alkotja az enzim hidrogenáz részét, ezek a [NiFe] hidrogenázokra jellemző kis és nagy alegység, a maradék két alegység diaforázokkal mutat aminosav szekvencia szinten hasonlóságot. A hidrogenáz aktivitás mellett mindkét citoplazmatikus [NiFe] hidrogenáz rendelkezik kén-redukáló aktivitással is (Ma és mts., 1993, Ma és mts., 2000), valójában mindkét enzim esetében a polisulfid/elemi kén redukció preferált a hidrogén fejlesztő aktivitással szemben *in vitro*. Ezért sokáig azt gondolták, hogy ezek az enzimek vesznek részt a kén redukációjában, de a transzkripció szintű vizsgálatok és enzimaktivitás mérések kimutatták, hogy kén jelenlétében expressziójuk nagy mértékben csökken (Adams és mts., 2001).

A két szolubilis hidrogenáz (szulfhidrogenázI és II) képes NADPH-t felhasználva hidrogént fejleszteni. A NADP redukcióját a ferredoxin:NADP oxidoreduktáz (FNOR, más néven szulfid dehidrogenáz) végzi, redukált ferredoxint használva (Ma és Adams, 1994). A *P. furiosus* növekedése során acetátot, széndioxidot, hidrogént és alanint termel. A glükóz fermentációs úton alapján minden acetát molekula létrejötte négy ferredoxin redukciójával jár, így a növekedés során keletkezett acetát mennyiségéből becsülhető a sejtben lévő redukáló erő mennyisége. A létrejött acetát mennyisége alapján kiszámolható, hogy milyen enzimaktivitás szükséges ahhoz, hogy a lebontó folyamatok során létrejött redukáló erőtől a sejt hidrogén formájában megszabaduljon. A piruvát:ferredoxin oxidoreduktáz (POR) és FNOR aktivitása elég magas volt, de a szulfhidrogenázok NADPH-függő hidrogénfejlesztő aktivitása túl alacsonynak bizonyult ennek a feladatnak az ellátásához. Emellett ezek a hidrogenázok nem képesek ferredoxint elektron donorként használni, így feltételezték egy másik hidrogenáz rendszer jelenlétét a sejtben (Silva és mts., 2000).

Az *E. coli* HybC fehérje aminosav szekvenciájával elvégezték a *P. furiosus* genomból nyert fehérjeszekvenciák összehasonlító vizsgálatát (Maeder és mts., 1999). Találtak olyan

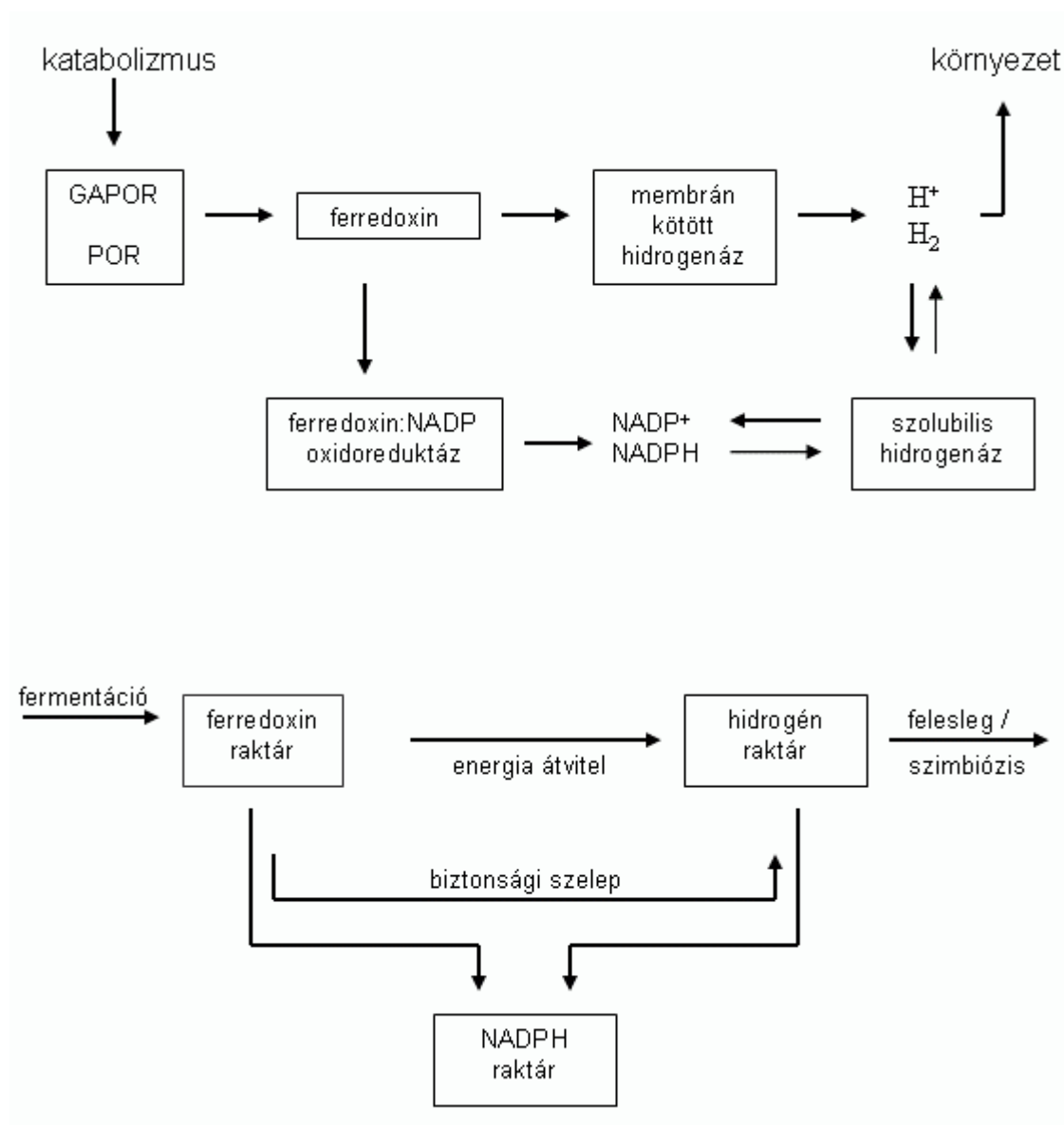
gént, amely néhány membrán kötött hidrogenáz nagy alegységéhez hasonló fehérjét kódol (Silva és mts., 2000). A gént tartalmazó operon 14 génből áll és az *mbh* (membrane-bound hydrogenase) nevet kapta (Sapra és mts., 2000). A géneket riboszómális kötőhelyek előzik meg és szekvencia szinten hasonlóságot mutatnak *R. rubrum* CO-indukált hidrogenázának és *M. barkeri* Ech hidrogenázának alegységeivel.

A sejtfrakciókkal végzett mérések megmutatták, hogy hidrogenáz aktivitás található a citoplazma membrán frakcióban. A membrán kötött hidrogenáz a [NiFe] hidrogenázokra nem jellemző módon igen magas H₂ fejlesztés / H₂ felvétel arányt mutatott (250 : 1), és képes volt redukált ferredoxinból hidrogént fejleszteni. Akárcsak a két citoplazmatikus hidrogenáz esetében, Mbh expressziója jóval magasabb kén hiányában felnevelt sejtekben, mint kén jelenlétében (Adams és mts., 2001)

A modell szerint a fermentáció során keletkező redukáló erő (főként redukált ferredoxin) Mbh-ra kerül, ami egy energiakonzerváló respirációs rendszer része (Sapra és mts., 2003). A korábban feltételezett FNOR-szulfhidrogenáz útvonal egyrészt biztonsági szelepként működik abban az esetben, ha olyan mennyiségű redukáló erő halmozódik fel a sejtben, amit a membránkötött hidrogenáz már nem tud feldolgozni, másrészt a bioszintetikus folyamatokhoz szükséges NADPH előállítását végzi. A *P. furiosus* hidrogén metabolizmusának modellje az 1.5. ábrán látható (Silva és mts. 2000).

Egy *mbh*-hoz nagyon hasonló felépítésű 13 génből álló operon is megtalálható *P. furiosus* genomában (Silva és mts., 2000) MbhL aminosav szekvenciáját használva a BLAST keresés során. Az operon az *mbx* nevet kapta. Azonban ennek a komplexnek a hidrogenáz nagy alegység homológja jelentős eltérést mutat szekvencia szinten a [NiFe] kötőhelyen a jól ismert konszenzustól. Mindkét [NiFe] koordináló CxxC motívumban a második ciszteint egy savas karakterű aminosav helyettesíti, ami nem teljesen ismeretlen, megtalálható *P. abyssi* és *P. horikoshii* genomok hasonló kötőmotívumokat tartalmazó géntermékeiben is.

Mbh-hoz és *mbx*-hez nagy homológiát mutató operonok találhatók a közeli rokon *P. abyssi*-ben (Cohen és mts., 2003) és *P. horikoshii*-ben (Kawarabayasi és mts., 1998), valamint *T. kodakaraensis*-ben (Fukui és mts., 2005) is. Emellett *P. abyssi* genom szekvenciájának vizsgálata során találtak egy nyolc génből álló operont, mely által kódolt fehérjék *in silico* analízis alapján szintén egy membrán kötött hidrogenáz alegységei. Érdekes, hogy ez az operon nem található meg a két másik *Pyrococcus* fajban és *T. kodakaraensis*-ben sem.



1.5. ábra A *P. furiosus* hidrogén metabolizmusának javasolt modellje (Silva és mts., 2000).

Rövidítések: GAPOR: gliceraldehyd 3-foszfát:ferredoxin oxidoreduktáz; POR: piruvát:ferredoxin oxidoreduktáz

1.3.4. *Thermococcus litoralis* DSM 5473 és hidrogenázai

A *T. litoralis*-t sekélytengeri, vízalatti hőforrások környékéről izolálták Olaszország partjainál. Az izolátum 0,5-3,0µm átmérőjű, coccoid formát mutató sejt. Elektron mikroszkóppal a sejtet körülvevő fehérjeburok figyelhető meg.

A törzs képes növekedni az 55°C-tól 98°C-ig terjedő hőmérsékleti és pH=4,0-től pH=8,0-ig terjedő pH tartományban, növekedési optimuma 85°C és a pH=6,0 érték (Neuner

és mts., 1990). Obligát heterotróf, képes növekedni komplex szubsztrátokon, mint pl. az élesztőkivonat, pepton, tripton, kazein és hús kivonat, kizárólag szénhidrátot tartalmazó tápoldaton nem sikerült növekedést megfigyelni, de a maltóz hozzáadása peptidet tartalmazó tápoldathoz stimuláló hatással bír. Növekedését kén jelenléte serkenti, melyet H₂S termelés kísér. A *P. furiosus*-hoz hasonlóan módosított Embden-Meyerhoff glikolitikus útvonal található benne (Kengen, 1996), és a *P. furiosus*-ban megismert peptid fermentációban szerepet játszó enzimek izolálhatók *T. litoralis*-ból is (Mai és Adams, 1996). A fermentáció végterméke acetát, alanin, széndioxid és hidrogén.

A *T. litoralis* mindkét szolubilis hidrogenázát kódoló operont izolálták és megszekvenálták (*hyh-1*, *hyh-2*) (Rákhely és mts., 1999; Tóth András, 2002). A szolubilis hidrogenáz-1 enzimet tisztították és jellemezték is (Rákhely és mts., 1999). Mindkét hidrogenáz szekvencia szinten nagy hasonlóságot mutat a *P. furiosus* megfelelő fehérjéjével. Csoportunkban izoláltak egy a *P. furiosus*-ban megtalált *mbh* operon *mbhA* génjével nagy hasonlóságot mutató genom régiót, ami arra utal, hogy a membrán kötött hidrogenáz *T. litoralis*-ban is megtalálható. A *P. furiosus mbx* operonjának megfelelő operon meglétéről vagy hiányáról nincs adatunk.

A *T. litoralis* jó alanya a hipertermofil mikroorganizmusok kutatásának, könnyű tenyésztetősége miatt. Nem obligát kén-függő, így növesztése nem igényli költséges korrózióálló fermentorok használatát, és képes légköri nyomáson nőni ellentétben pl. közeli rokonával *P. abyssi*-vel. Emellett az eddigi eredmények szerint több szolubilis illetve membrán kötött hidrogenáz található benne, ami alkalmassá teszi hőstabil, ellenálló hidrogenázok izolálására. Mivel mind szénhidrátokat, mind peptideket képes fermentálni, miközben hidrogén fejleszt, biotechnológiai szempontból is jelentős mikroorganizmus. Laboratóriumunkban is kifejlesztettek egy olyan eljárást, amelyben állati eredetű hulladékból két lépcsőben biohidrogén fejleszthető (Bálint és mts., 2005). A biohidrogén termelő lépésben *T. litoralis*-t használtak és a törzs ebben a rendszerben jobb hatékonysággal működött, mint pl. a *P. furiosus*. Ez alapján feltételezhető, hogy – bár a *T. litoralis* igen sok tekintetben hasonlít a *P. furiosus*-hoz – a két törzs metabolikus sajátágaiban van különbség. Ez a biohidrogén termelő kísérletek alapján a peptid – hidrogén anyagcsere útvonalban lakozhat, amelyből a következőkben a hidrogén anyagcsere komponenseire összpontosítottam vizsgálataimat.

2. Célkitűzések

A fosszilis energiahordozók kiváltásának egy lehetséges alternatívája a megújuló forrásból termelt hidrogén. A hidrogén gáz előállítható mikroorganizmusok felhasználásával a fotoszintézishez vagy fermentációs lebontó folyamatokhoz kapcsolódva. A néhány évtizede felfedezett extrém körülmények között élő mikroorganizmusokra jellemző, hogy különböző környezeti hatásoknak igen ellenálló fehérjékkel rendelkeznek. Az e csoportba tartozó hipertermofil mikroorganizmusokból származó enzimek nem csak a szélsőségesen magas hőmérséklettel, de oldószerekkel és sokszor inhibitorokkal szemben is rezisztenciát mutatnak. E tulajdonságuknak köszönhetően már ma is több enzimüket széles körben alkalmazzák a biotechnológiai iparban (Demirjian és mts., 2001).

Munkám célja az volt, hogy a hipertermofil archaeobaktérium *Thermococcus litoralis* hidrogén anyagcseréjét és az abban résztvevő enzimeket alaposan megismerjem, jövőbeni alkalmazásuk reményében.

Ezen célok elérése érdekében a következő kérdésekre próbáltam választ kapni:

- Megtalálhatók-e a mezofil mikroorganizmusokból már jól ismert hidrogenáz érésben szerepet játszó fehérjéket kódoló gének a sok szempontból eltérő archaeobaktériumokban, esetünkben *T. litoralis*-ban?
- Lehetséges-e az említett kisegítő gének termékeit működőképes formában termeltetni heterológ gazdában?
- Található-e *T. litoralis*-ban hidrogén fejlesztő membrán kötött hidrogenáz a már leírt szolubilis enzimek mellett?
- Mi a szerepe a sejt hidrogén metabolizmusában az 1-es szolubilis hidrogenázt kódoló operontól 5' irányban megtalált gének által kódolt fehérjekomplexnek?

3. Anyagok és módszerek

A kísérletekhez felhasznált vegyszerek nagy része a Sigma (USA), Reanal Vegyszergyár (Magyarország) és a Merck (Németország) cégek terméke.

3.1. Baktérium törzsek és nevelésük

A munka során használt törzsek listája az 3.1. táblázatban található.

Sejtek növesztése, tápoldatok és táptalajok

A *T. litoralis* DSM5473 sejteket 85°C-on, szigorúan anaerob körülmények közt kénmentes CM tápoldatban tartottam fenn.

CM tápoldat (1l): baktópepton 5g, élesztő kivonat 1g, NaCl 24g, MgCl₂ x 6H₂O 10,6g, Na₂SO₄ 4g, CaCl₂ x 2H₂O 1,5g, KCl 0,7g, NaHCO₃ 0,2g, KBr 0,1g, SrCl₂ 0,025g, H₃BO₃ 0,03g, rezazurin 0,2mg, cisztein 0,4g, pH=6,5.

Az oxigénmentes szaporítás anaerob munkatérben (Bactron Anaerobic/Environmental Chamber, ShellLab, 5% H₂ + 95% N₂ atmoszféra), illetve gumiszeptummal lezárható anaerob üvegekben (Wheaton serum bottle, Sigma-Aldrich) történt.

Fermentorban növesztésnél 5 liter térfogatú Biostat[®]C CT5-2 (B.Braun Biotech. International) típusú fermentort használtam. A tenyésztési körülmények a következők voltak: 85°C, 100 rpm állandó kevertetés, nitrogén gáztér, pH=6,5.

A CM tápoldat mellett még az alábbi tápoldatokat használtam:

Minimál tápoldat (D) (1l): NaCl 24g, MgCl₂ x 6H₂O 10,6g, Na₂SO₄ 4g, CaCl₂ x 2H₂O 1,5g, KCl 0,7g, NaHCO₃ 0,2g, KBr 0,1g, SrCl₂ 0,025g, H₃BO₃ 0,03g, Na₂WO₄ x 2H₂O 3mg, K₂HPO₄ 140mg, FeSO₄ x 7H₂O 1,4mg, MnSO₄ x 7 H₂O 0,5mg, CoSO₄ x 7 H₂O 0,36mg, NiCl₂ x 6 H₂O 0,2mg, Na₂MoO₄ x 2 H₂O 0,001mg, CuSO₄ x 5 H₂O 0,001mg, piridoxin-HCl 0,1mg, p-aminobenzolsav 0,05mg, nikotinsav 0,05mg, DL-Ca-pantoténsav 0,05mg, tiamin-HCl 0,05mg, DL-6,8-lipoin sav 0,05mg, riboflavin 0,04mg, biotin 0,2mg, folsav 0,02mg, 20 aminosav 200mg/aminosav, adenin 10mg, uracil 10mg, rezazurin 0,2mg, cisztein 0,4g, pH=6,5.

DM tápoldat: minimál tápoldat kiegészítve 0,5% maltózzal.

DP tápoldat: minimál tápoldat kiegészítve 0,5% peptonnal.

Kén jelenlétében történő növesztéskor 1g elemi ként tettem 1l tápoldatba.

A *R. eutropha* törzseket FN tápoldaton tartottam fenn, a komplementációs kísérletekhez a törzseket FGN tápoldaton növesztettem (Dernedde és mts., 1996).

Az *E. coli* törzseket 1,5% agar tartalmú Luria-Bertani (LB) lemezekben tartottam fenn. Kompetens sejt készítés illetve transzformáció során SOB illetve SOC tápoldatot használtam. A komplementációs kísérletekhez az *E. coli* törzseket a hidrogén fejlesztő aktivitás méréshez TGYEP tápoldaton (Maier és mts., 1996), hidrogén felvevő aktivitás mérésekhez Sawers és mts. publikációjában leírt tápoldaton növesztettem (Sawers és mts. 1985).

LB (1l): NaCl 5g, élesztő kivonat 5g, tripton 10g, pH=7,0.

SOB (1l): tripton 20g, élesztő kivonat 5g, NaCl (5M) 2ml, KCl (2M) 1,25ml, MgSO₄ (1M) 10ml, MgCl₂ (1M) 10 ml, pH=7,0.

SOC (1l): SOB 20mM glükózzal kiegészítve.

M9 (1l): Na₂HPO₄ 6g, KH₂PO₄ 3g, NH₄Cl 1g, NaCl 0,5g, CaCl₂ 3mg.

Az antibiotikumokat a következő koncentrációkban alkalmaztam: ampicillin 100µg/ml, kanamycin 25µg/ml, gentamicin 400µg/ml és tetraciklin 15µg/ml.

3.2. DNS-sel végzett munkák

3.2.1. Kromoszómális DNS tisztítása

A centrifugált sejteket 10ml 50mM Tris-HCl (pH=8,0), 40mM EDTA, 25% szacharóz összetételű pufferrel mostam, majd az 5ml pufferben újra felfuszpendált sejteket 1 órán át 37°C-on inkubáltam 50µl proteinázK (20mg/ml), és 2ml EDTA (0,5M (pH=8,0)) hozzáadása után. Ezután a mintát TE pufferrel (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH=8,0) 18ml térfogatra egészítettem ki, majd 3,75ml SDS (10%), 1,35ml Triton X-100 (25%), 4,05ml NaCl (5M) és 3,75ml CTAB (10%) + NaCl (0,7M) oldat hozzáadásával tártam fel a sejteket 45 percig 65°C-on. Ezután kloroformos extrakciót végeztem azonos térfogatnyi kloroform:izoamilalkohol 24:1 arányú keverékével. A kromoszómális DNS-t 0,6 x térfogat izopropanollal csaptam ki szobahőmérsékleten. A DNS szálat üvegbotlal kitekerve 70%-os etanolba vittem át, majd alkoholos mosás és szárítás után a DNS-t TE pufferben oldottam fel (Ausubel és mts., 1996).

3.2.2. Plazmid DNS tisztítás *E. coli*-ből

A QIAGEN GmbH plazmid izoláló rendszerével (Plasmid Mini Kit, Kat. Szám:12123) tisztítottam DNS-t 3ml antibiotikum tartalmú LB tápoldatban felnőtt tenyészetből.

3.2.3. DNS manipuláció, transzformáció, konjugáció

A DNS manipulációs lépések (emésztés restrikciós endonukleázzal, DNS ragadósvég tompítás, polinukleotid kináz kezelés, foszfatáz kezelés, ligálás) a gyártó cégek utasításainak megfelelően történtek (Fermentas, Stratagene, Amersham Biosciences).

A kompetens sejt készítés és a transzformáció a SEM (simple and efficient method) módszerrel történt (Inoue és mts., 1990).

A *R. eutropha* törzsek konjugációja Dervedde szerint történt (Dervedde és mts., 1996).

3.2.4. DNS fragment izoláció gélből

A DNS fragmentek izolálását agaróz gélből DNS izoláló kittel (Fermentas, DNA Extraction Kit, Kat. Szám: #K0513) végeztem.

3.2.5. Polimeráz láncreakció

A PCR-t PCRExpress (Hybaid) thermocycler készülékben hajtottam végre. Az alkalmazott végkoncentrációk: primerek 1 μ M, dNTP 200 μ M, enzim, puffer és Mg²⁺: a használt polimerázt gyártó cég utasításainak megfelelően. A munka során használt primerek leírása a 3.2. táblázatban található.

3.2.6. Real-Time PCR

Az abszolút kvantifikációs Real-Time PCR kísérleteket az Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System készülékében végeztem. A reakciókban a SYBR® Green PCR Master Mix terméket használtam a gyártó cég utasításainak megfelelően (Applied Biosystems). A kísérletek során a mennyiségi meghatározáshoz a vizsgált genom régiót tartalmazó plazmidot (pFhl7 és pFhl17) használtam 100-0,001pg koncentrációban tízszeres hígítási sort képezve.

3.2.7. Southern blot, kolónia- és plakkhibridizáció

A restrikciós endonukleázokkal emésztett genomi DNS-t 1%-os agaróz gélen TAE pufferben (0,04 M Tris-acetát, 0,001 M EDTA, pH=8,0) választottam el. A DNS fragmenteket a gélből kapilláris módszerrel (Ausubel és mts., 1996) vittem át Hybond-N⁺ nylon membránra (Amersham Biosciences). A kolónia- és plakkhibridizációnál Hybond-C nitrocellulóz membránt (Amersham Biosciences) használtam. A DNS-t 2 órán át tartó, 80°C-on történő sütéssel kötöttem fel a membránra. A Southern, kolónia- és plakkhibridizációk 68°C-on

történtek (Ausubel és mts., 1996). A DNS próbák jelölése és a detektálás a gyártó cég utasításainak megfelelően történt (DIG DNA Labeling and Detectation kit , Roche, Kat. Szám:11 093 657 910).

3.2.8. Nukleotidsorrend meghatározása

A nukleotid sorrend meghatározás Applied Biosystems 373 Stretch DNA sequencer készülékkel történt.

3.3. A *T. litoralis hypCD* géneket kódoló genomrégió izolálása

A kísérleteket a korábban *T. litoralis* genomból készült *EcoRI* fág könyvtárral végeztem (Rákhely és mts., 1999). A könyvtárral végzett munkák során a Stratagene ZAP expressziós vektor klónozó rendszerre (Kat. Szám:#239211) vonatkozó leírást követtem. A fágkönyvtárral *E. coli* XL1-Blue MRF' sejteket fertőztem. A hibridizáció során pTLHDP plazmidról készült jelölt próbával pozitív jelet mutató plakkokat kivágtam a lemezből. A fágokból Exassist™ helper fággal (M13) *E. coli* XL0LR törzsét használva gazdaként kettősszájú fagemid (pBK-CMV) formában nyertem ki a rekombináns klónokat, és a sejteken kolónia hibridizációt végezve kerestem meg a kívánt genom régiót tartalmazó telepet.

3.4. A *T. litoralis hyh* operontól 5' irányban elhelyezkedő genomrégió izolálása

Az *fhl* operont több lépcsőben sikerült izolálni. Az első pFhl1 klónt, ami a *T. litoralis* genom egy 3,3 kb hosszú darabját tartalmazta, *T. litoralis* genomiális *EcoRI* fágkönyvtárból plakkhibridizációval izoláltam, a pLHU1/1 klón *PstI*-*AccI* fragmentjét használva jelölt próbaként. A későbbiekben kiderült, hogy a könyvtár készítése során a DNS valószínűleg az egyik végén eltört, 174 bp-ral az *NdeI* helytől 3' irányban, de ennek ellenére ez a vég is valamely módon képes volt beépülni az *EcoRI* enzimmel emésztett fág DNS-be.

A következő lépésben a pFhl2 klónból származó fragmentet használtam jelölt próbaként *EcoRI*-*XbaI* részleges genomi könyvtár átvizsgálására (Ausubel és mts., 1996). Így nyertem a pFhl6-os klónt, ami egy nagyjából 2 kb hosszú, eddig ismeretlen szakaszt tartalmazott.

A harmadik és egyben utolsó lépésben a pFhl10-es klón *XhoI*-*XbaI* fragmentjét használtam jelölt próbaként *T. litoralis BamHI-EcoRV* részleges genomi könyvtár átvizsgálására. Az így kapott pFhl17-es klón nukleotidsorrendje egyrészt szubklónozás, másrészt primer séta segítségével lett meghatározva.

3.5. A dolgozatban szereplő konstrukciók készítésének menete

3.5.1. A heterológ komplementáció során használt plazmid konstrukciók készítése

pTERP: A pRK415 vektor egy 2,8 kb-os *tetR* promoter régiót hordozó *HindIII*-*Apal* fragmentjét klónoztam pBtSK+ vektorba. Ezen a konstrukción PCR-t végeztem a T7 szekvenáló és RP1TET01 primerekkel. Ez utóbbival egy *PstI* helyet hoztam létre a fragment 5' végénél. A terméket pBSP-/*SmaI* plazmidba klónoztam. A felesleges részek eltávolítása érdekében *Sall* emésztés után önligálást végeztem, így kapva meg pTERP konstrukciót.

pTHC: a pHCD11 plazmidon PCR-t végeztem a TLHC01, T3 primerekkel. A kapott terméket *FspI* emésztés, feltöltés és kináz kezelést követően *PstI* enzimmal emésztett, majd tompított pTERP vektorba ligáltam.

pTHD: a pHCD11 plazmidon PCR-t végeztem a TLHYPD01, T3 primerekkel. A kapott terméket feltöltés és kináz kezelést követően *PstI* enzimmal emésztett, majd tompított pTERP vektorba ligáltam.

pHTHD: pTHD vektorból *Sall*-*EcoRI* enzimmal vágtam ki a *tetR-hypD* régiót és pHRP309/*Sall*-*EcoRI* plazmidba ligáltam.

pHTHC: pTHC vektorból *Sall*-*EcoRI* enzimmal vágtam ki a *tetR-hypC* régiót és pHRP309/*Sall*-*EcoRI* plazmidba ligáltam.

3.5.2. pHypC konstrukció készítése

pHCD11 plazmidról T7 és TLHC02R primerekkel amplifikáltam ki a *hypC* gént hordozó régiót, majd a PCR fragmentet *BamHI* enzimmal emésztettem, feltöltés után a terméket pBS19+/*SmaI* plazmidba ligáltam.

3.5.3. pET32a+*fhlB* konstrukció készítése

A fehérje túltermeléshez használt fúziós konstrukció elkészítéséhez a pET expressziós rendszert (Novagen) használtam. A FhlB fehérjét kódoló gén egy darabját pET32a(+) vektorba klónoztam "in frame" oly módon, hogy egy *trx*-FhlB-His fúziós fehérje termeltetésére alkalmas konstrukció jöjjön létre. Az *fhlB* gént tartalmazó pFhl3 szubklónt *HincII*-*SacI* enzimekkel emésztettem, majd a kapott fragmentet pBS19+ plazmid *SacI*-*HincII* helyére ligáltam. Az így nyert pBS+*fhlB* plazmidon PCR-t végeztem a *prc2pcp* és a T7 szekvenáló primerrel. A PCR terméket megfelelően kezelve pET32a(+) *EcoRV* helyére ligáltam, a konstrukciót (pET32a+*fhlB*) a túltermeléshez *E. coli* BL21(DE3)-CodonPlus-RIL törzsbe (Stratagene) transzformáltam.

3.6. RNS-sel végzett munkák

3.6.1. RNS izolálás

RNS izoláláshoz a Sigma Tri-Reagent™ termékét használtam, a gyártó útmutatásait követve. A tisztítás során 100ml hypovial üvegben felnevelt tenyészetből indultam ki. Az RNS-t DNaseI (Fermentas) kezelésnek vettem alá, majd PCR-rel ellenőriztem, hogy valóban sikerült-e eltávolítani a DNS szennyeződést. Az RNS mennyiségét NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies) készülékkel mértem meg.

3.6.2. Primer extenzió

A transzkripció start hely meghatározásához először totál RNS-t izoláltunk *T. litoralis*-ból, majd a TLHYPPE végjelölt primert használtuk a primer extenzió során (Sambrook és mts., 1989).

3.6.3. Reverz transzkripció

A kísérletben M-MLV Reverse Transcriptase (Promega) illetve RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas) enzimet használtam a gyártó cég útmutatásainak megfelelően, 1µg totál RNS-t használva templátként.

3.7. Fehérjével végzett munkák

3.7.1. Egydimenziós poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE)

A natív (natív-PAGE) és denaturáló (SDS-PAGE) poliakrilamid gélek készítése és futtatása, a Current Protocols in Molecular Biology című könyvben leírtaknak megfelelően történt (Ausubel és mts., 1996). A Colourless Native PAGE (CN-PAGE) kísérleteket Schagger publikációja alapján végeztem (Schagger és mts., 1994).

3.7.2. Fehérjégél festés

A fehérjék Coomassie és ezüst festése a Current Protocols in Molecular Biology című könyvben leírtak szerint történt (Ausubel és mts., 1996).

3.7.3. Fehérjekoncentráció meghatározása Lowry szerint (Micro Lowry method)

A triklór-ecetsav/deoxikolát módszerrel (Ausubel és mts., 1996) kicsapott fehérjét 0,8ml 0,25M NaOH-ban oldottam fel. A fehérje koncentráció meghatározása a Micro Lowry módszerrel történt (Yeang és mts., 1998). A minták abszorbanciáját 750nm-en mértem BIORAD SmartSpec™ 3000 spektrofotométerben. Standardként marha szérumban albumint használtam.

3.7.4. Bakteriofág T7 RNS polimeráz alapú fehérje expressziós kísérletek

A kísérleteket Tabor és Richardson publikációjában leírtak szerint végeztem (Tabor és Richardson, 1985). A megfelelő plazmiddal transzformált *E. coli* BL21(DE3) törzset 18 aminosavval (0,1%; metionin és cisztein nélkül) kiegészített M9 tápoldatban neveltem 37°C-on OD₆₀₀=0,4 érték eléréséig. A sejtszuszpenziót ezután kétfelé osztottam: az egyiket 0,4mM IPTG hozzáadásával indukáltam míg a másikat IPTG nélkül rázattam tovább. Egy óra inkubáció után mindkét tenyészethez rifampicint (200µg/ml) adtam, majd újabb három óra elteltével 10µCi [³⁵S] metionin izotóp mellett inkubáltam egy órát. Ezután a 2-2ml sejtet centrifugálással összegyűjtöttem és 40µl TE-ben vettem fel őket mosás után. A mintákat denaturáló poliakrilamid gélben választottam el. A fehérjefuttatás után a gél szűrő papírra (Gel Blotting Paper, GB002, Schleicher&Schuell) szárítottam, és fényérzékeny filmet (Medifort SFB) tettem rá, majd megfelelő expozíciós idő után előhívtam a jeleket.

3.7.5. trx-FhIB-His fúziós fehérje túltermelése pET (T7 RNS polimeráz) expressziós rendszerrel

A fehérje túltermeléshez a sejteket OD_{600nm}=0,5-0,8 érték eléréséig növesztettem 50 ml LB táptalajon 37°C-on rázatva. A kultúrát 0,4mM IPTG mellett indukáltam 3 órán át. A sejteket szonikálással (3 x 10 sec, közepes fokozat) tártam fel, majd a felülúszó és csapadék frakciót centrifugálással különítettem el (10000 x g, 10 perc, 4°C). A kapott felülúszó frakciót félretettem, a csapadékot pedig azonos térfogatú UIMAC pufferben (20mM Tris-HCl (pH=7,9), 0,5M NaCl, 8M urea) szuszpendáltam fel. SDS-PAGE segítségével vizsgáltam, hogy melyik frakció tartalmazza a tisztítandó fehérjét (Ausubel és mts., 1996). Mivel a túltermelt fehérje mind a szolubilis, mind a csapadék frakcióban jelen volt, az immunizáláshoz mind szolubilis mind csapadék frakcióból tisztítottam a fúziós fehérjét.

3.7.6. His-tag fúziós fehérje tisztítása IMAC (Immobilised Metal-Chelate Affinity Chromatography) módszerrel

A trx-FhlB-His fúziós fehérje tisztításhoz IMAC oszlopon a szonikálást követő centrifugálással nyert felülúszó vagy csapadék frakciót használtam. A tisztítandó mintát 500 μ L Chelating SepharoseTM Fast Flow (Amersham Biosciences) nikkellel aktivált oszlopra kötöttem fel. Az oszlopot 2,5ml emelkedő imidazol koncentrációjú (20, 50, 100, 200 és 500 mM) IMAC (20mM Tris-HCl (pH=7,9), 0,5M NaCl) illetve UIMAC pufferrel eluáltam (IMAC + 8M urea), attól függően, hogy felülúszó vagy csapadék frakciót használtam. Végül az oszlopot 1mM EDTA tartalmú (U)IMAC-0 pufferrel mostam. A trx-FhlB-His fúziós fehérje mindkét esetben 100mM-os imidazol koncentrációnál mosódott le az IMAC oszlopról. Az imidazol eltávolítás érdekében a fehérjét tartalmazó frakciót ezerszeres térfogatú 1 x PBS pufferrel (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 4,3mM Na₂HPO₄ x 7H₂O, 1,4mM KH₂PO₄, pH=7,3) szemben dializáltam 24 órán át, egyszer cserélve az oldatot (Ausubel és mts., 1996).

3.7.7. Kerámia hidroxipatit kromatográfia (CHT)

A *T. litoralis* sejtekből készített membrán frakciót 10mM K-foszfát pufferrel (pH=7,0) előkezelt kerámia hidroxipatittal (CHT[®] Ceramic Hydroxyapatite (Bio-Rad)) töltött oszlopra vittem (Bio-Rad MT20). Az elválasztás Biologic DuoFlow Protein Purification System (Bio-Rad) FPLC készülékkel történt, az oszlopot 10-500mM K-foszfát puffer (pH=7,0) lineáris grádienssel eluáltam.

3.8. Antisérum készítés és Western hibridizáció

3.8.1. Nyulak immunizálása

Az ellenanyag előállításához két 1,5kg-os fehér házi nyulat immunizáltunk. A nyulakat 100 μ g trx-FhlB-His fúziós fehérjével oltottuk be teljes Freund adjuvánssal (Sigma) együtt. Az oltóanyag térfogata 1ml volt, ezt négy helyre adtuk be a nyaki területen bőr alá. Az első immunizáló oltást követően három hetenként adtunk emlékeztető oltást felére csökkentett mennyiségű antigénnel nem teljes Freund adjuváns (Sigma) mellett. Az immunválasz ellenőrzéséhez az oltást követő hetedik napon vettünk a fülvénából 1ml vért, melyet indirekt ELISA-val vizsgáltam (Ausubel és mts., 1996).

3.8.2. Indirekt ELISA

Az ELISA lemezre lyukanként 100 μ l 2 μ g/ml-es trx-FhlB-His fúziós fehérjét vittem fel és egy éjszakán át hagytam felkötődni 4°C-on. A többi lépést szobahőmérsékleten végeztem. A lemezt háromszor mostam 1 x PBS pufferrel, majd 1 óráig inkubáltam blokkoló oldattal (10mM Tris-HCl (pH=7,4), 150mM NaCl, 2% BSA). Újabb mosás után a nyúlból nyert szérumból készült hígítási sort vittem fel a lemezre és 2 órát állni hagytam. Mosást követően

a lemezt alkalikus foszfatázzal konjugált számár anti-nyúl IgG-vel (Sigma-Aldrich) inkubáltam (1:5000 hígítás blokkoló oldatban) egy órán át. Mosás után 100 μ l dNPP-t vittem a lemezre, a szín kialakulásáig sötétben tartottam, majd a reakciót 200 μ l 2M NaOH hozzáadásával állítottam le (Ausubel és mts., 1996). ELISA olvasóval 405 nm-en olvastam le az eredményt (3.1. ábra). Mivel mindkét nyúl jól válaszolt a beadott antigénre, a nyulakat egy héttel a harmadik emlékeztető oltás beadása után elvégeztettük, és a nyert szérumból IgG frakciót tisztítottam, amelyet Western hibridizációs kísérletekben vizsgáltam tovább.

3.8.3. IgG frakció tisztítás

A nyulakból elvégeztetés után 100 ml vért nyertünk. A vérből a Current Protocols in Molecular Biology című könyvben leírtaknak megfelelően nyertem szérumot (Ausubel és mts., 1996). Az IgG frakció kicsapásához egy térfogat 33%-os telített ammónium-szulfát (sAS) oldatot adtam állandó keverés mellett cseppenként két térfogat szérumhoz. Három óra állandó 4°C-on történő keverés után a mintát lecentrifugáltam (12000 x g, 20 perc 4°C), a csapadékot az eredeti szérum térfogatnak megfelelő mennyiségű 33%-os sAS oldatban szuszpendáltam fel. Újbóli centrifugálás után a csapadékot az eredeti szérumtérfogat egytizedének megfelelő mennyiségű 1x PBS pufferben oldottam fel. A tisztított szérumot az ammónium-szulfát teljes eltávolítása érdekében 24 órán át 4°C-on dializáltam 2 x 1l felvivő pufferrel (20mM Tris-HCl (pH=8,0), 25mM NaCl, 0,02% NaN₃) szemben. A szérumot tovább tisztítottam DEAE Affi-Gel Blue Gel oszlopon (Bio-Rad). A szérum tisztításához az eredeti szérum térfogatnak megfelelő mennyiségű töltetet (50 ml) használtam. Az oszlopot 3 térfogat felvivő pufferrel mostam, és 10ml-es frakciókat szedtem. A tisztított antiszérumot 4°C-on tároltam 0,1% NaN₃ mellett (Ausubel és mts., 1996).

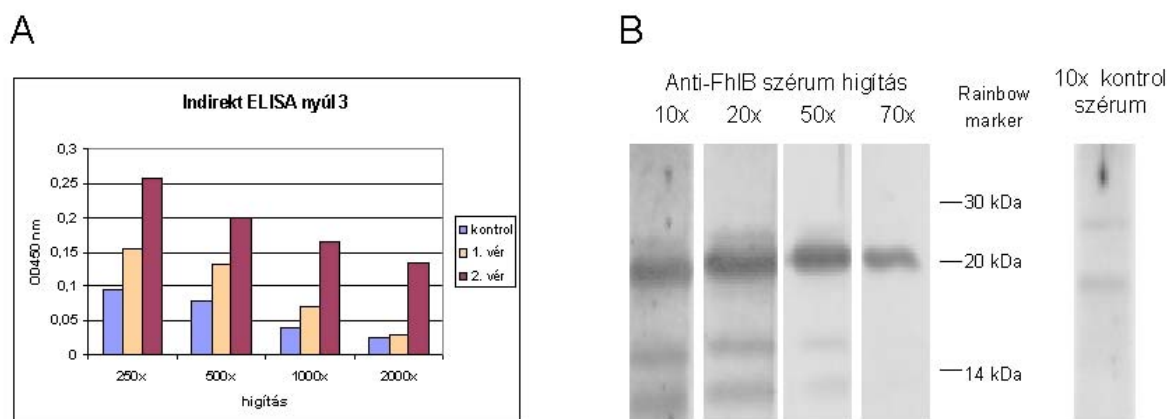
3.8.4. Western blot, hibridizáció és detektálás

A poliakrilamid gélt futtatás után 30 percig rázattam Towbin pufferben (25mM Tris-HCl (pH=8,3), 192mM glicin, 20% metanol). A fehérjetranszfert Hybond™-ECL™ (Amersham Biosciences) nitrocellulóz membránra Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad) készülékben végeztem, 30 percig 25V-on (Ausubel és mts., 1996).

A Western hibridizációt a Current Protocols in Molecular Biology című könyvben leírtaknak megfelelően végeztem (Ausubel és mts., 1996). A poliklonális anti-FhIB ellenanyagot százszoros, a másodlagos ellenanyagot (számár anti-nyúl IgG tormaperoxidáz konjugátum (Amersham Biosciences)) 10000-szeresre hígításban alkalmaztam. Az előhívás ECL illetve ECL⁺ (Amersham Biosciences) reagenssel történt a gyártó cég instrukcióit követve. A

membránra röntgen filmet (Medifort SFB) tettem és megfelelő expozíciós idő után a filmet előhívtam (Ausubel és mts., 1996).

Az elkészült ellenanyag ellenőrzéséhez *T. litoralis* összfehérjét választottam el SDS poliakrilamid gélen. A szérumból különböző hígításokat készítettem, és ezekkel hibridizáltam a membránokat (3.1. ábra). A kísérletet elvégeztem kontrol szérummal is. Jól látható, hogy a kontrol szérummal nem kaptam jelet, tehát az általam készített ellenanyag valóban a FhlB fehérjét ismeri fel.



3.1. ábra Az egyik trx-FhlB-His fúziós fehérjével immunizált nyúl immunválaszának ellenőrzése indirekt ELISA-val (A), és a 3-as nyúlból nyert anti-FhlB ellenanyag ellenőrzése Western hibridizációval (B). **A** Az „1. vér” az első emlékeztető, a „2. vér” a második emlékeztető oltás után nyert vér. A kontrol vér az első immunizálás előtt vett vért jelenti. **B** A 20 μ g *T. litoralis* összfehérje mintát 12%-os SDS poliakrilamid gélen választottam el.

3.9. Sejtfrakciók készítése

A komplementációs kísérletekhez a *R. eutropha* szolubilis és membrán kötött hidrogenáz enzimet a korábbiakban leírtaknak megfelelően választottam el (Schneider és Schlegel, 1976; Schink és Schlegel, 1979).

A *T. litoralis* sejteket French Press (ThermoIEC, French® Press) segítségével 20000 psi nyomást alkalmazva tártam fel. A sejtörmelék eltávolítása (20000 x g, 20 perc, 4°C) után a sejtmentes frakciót (felülúszó) szétválasztottam szolubilis és membrán frakcióra (100000 x g, 1,5 óra, 4°C). A membrán frakciót ezután kétszer mostam: a csapadékot 50mM Tris-HCl (pH=8,0) pufferben szuszpendáltam fel, majd újra centrifugáltam (100000 x g, 1,5 óra, 4°C). A membrán frakció tisztaságát glutamát-dehidrogenáz aktivitás méréssel ellenőriztem (Ma és mts., 1994b).

3.10. Enzimaktivitás mérés

3.10.1. Hidrogén felvevő aktivitás mérése

A hidrogén fogyasztását az elektron akceptor színváltozásán keresztül követtem nyomon Unicam UV/VIS-UV2 spektrofotométerben a Vision 3.41 szoftver kinetikai mérési módszerét alkalmazva, légmentesen zárható, 1cm fényúttal rendelkező küvettákban, hidrogén gáztérben.

A *T. litoralis* és *E. coli* aktivitás méréseket 0,4mM benzilviologén jelenlétében végeztem 600 nm-es hullámhosszon 85°C-on illetve 37°C-on. *R. eutropha* szolubilis hidrogenáz hidrogén felvevő aktivitását 0,8mM NAD⁺ jelenlétében, 340nm-en, 33°C-on, ugyenezen organizmus membrán kötött hidrogenáz aktivitását 570nm-en, 200μM metilénkék redox festék jelenlétében 52°C-on mértem.

3.10.2. Hidrogén fejlesztő aktivitás mérése

A hidrogén fejlesztő aktivitás mérést gumiszeptummal anaerob zárható szérum üvegekben (Wheaton serum bottle, Sigma-Aldrich) végeztem, 2ml térfogatban, a vizsgált törzs optimális növekedési hőmérsékletén. A reakció elegy 3mM metilviologént tartalmazott, a reakciót 300μl 0,3M koncentrációjú Na-ditionit hozzáadásával indítottam, és a fejlődő hidrogént 5-Å HP MOL-SIV kolonnával és TCD detektorral felszerelt Agilent Technologies 6890N típusú gázkromatográffal detektáltam.

3.10.3. Hidrogén felvevő aktivitás detektálása natív poliakrilamid gélben

A frakciók natív gélen történő elektroforézise után a gél 200ml 1mM benzilviologént tartalmazó 50mM Tris-HCl (pH=8,0) pufferben helyeztem és 85°C-on, N₂ gáztér alatt 20 percig inkubáltam. A gázteret H₂-re cseréltem, amit további 30 perc inkubáció követett. Az enzim lokalizációja a gélben az enzimaktivitáson keresztül a benzilviologén adott sávban látható elredukálása (kék szín megjelenése) révén detektálható. A redukált benzilviologén oxigénen elszíntelenedik, ezért a reakcióterméket 2-3ml 20mM 2,3,5-trifenil-tetrazólium-klorid oldat hozzáadásával fixáltam, mivel a keletkező piros színű termék már levegőn is stabil.

3.10.4. Formát-dehidrogenáz aktivitás mérés

A formát-dehidrogenáz kimutatására több redox festéket kipróbáltam, melyek a következők voltak: benzilviologén, DCPIP + PMS, NBT, TTK. A reakciót 200µl 0,1M koncentrációjú Na-formát hozzáadásával indítottam. A formát bontását az elektron akceptor színváltozásán keresztül követtem nyomon Unicam UV/VIS-UV2 spektrofotométerben a Vision 3.41 szoftver kinetikai mérési módszerét alkalmazva, légmentesen zárható, 1cm fényúttal rendelkező küvettákban 85°C-on, nitrogén gáztérben.

3.10.5. Formát-hajtott hidrogenáz aktivitás mérés

A mérést gumiszeptummal anaerob zárható szérum üvegekben (Wheaton serum bottle, Sigma-Aldrich) végeztem 85 °C-on, 2ml térfogatban. A reakciót 200µl 0,1M koncentrációjú Na-formát hozzáadásával indítottam, és a hidrogén fejlődést 5-Å HP MOL-SIV kolonnával és TCD detektorral felszerelt Agilent Technologies 6890N típusú gázkromatográffal ellenőriztem.

3.11. Bioinformatikai módszerek

A DNS és fehérje szekvenciák összehasonlítása és az adatbázisban való keresés a BLAST programmal történt (www.ncbi.nih.nlm.gov/BLAST). A fehérjék aminosav sorrendjének összevetései ClustalW 1.8 programmal (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/multi-align/multi-align.html>) készültek. A transzmembrán hélixek predikciójára a HMMTOP Version 2.0 programot használtam (<http://www.enzim.hu/hmmtop/index.html>) (Tusnády és Simon, 2001).

3.12. Accession numbers

A 10474 bp hosszú *Thermococcus litoralis* genom régió mely tartalmazza az *fhl* operont az AF039208, a *hypCD* géneket tartalmazó 4183 bp hosszú régió az AF319635 accession number alatt található a GenBank adatbázisban.

Törzsek és plazmidok	Tulajdonságok	Referencia és forrás
Törzsek		
<i>Thermococcus litoralis</i> DSM 5473		Neuner és mts. (1990)
<i>Escherichia coli</i> törzsek		
XL1-Blue MRF ⁺	$\Delta(mcrA)183, \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173, endA1, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1 lac [F' proAB lacI^f M15Z\Delta Tn10 (Tet^r)]^c$	Stratagene
BL21 (DE3)	<i>E. coli</i> B F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (r _B - m _B -) <i>dcm gal</i> λ (DE3)	Stratagene
BL21(DE3)-Codon Plus -RIL	<i>E. coli</i> B F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (r _B - m _B -) <i>dcm+ Tet^r gal</i> λ (DE3) <i>endA Hte [argU ileY leuW Cam^r]</i>	Stratagene
XL0LR	$\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacI^f Z\Delta M15Tn10 (Tet^r)]^c Su^- \lambda^r$	Stratagene
MC4100	<i>araD139 \Delta(argF-lac)U169 ptsF25 relA1 flbB5301 rpsL50 deoC1 rbsR</i>	Casadaban és Cohen (1979)
DHP-C	MC4100, $\Delta hypC$	Jacobi és mts. (1992)
DHP-D	MC4100, $\Delta hypD$	Jacobi és mts. (1992)
<i>Ralstonia eutropha</i> törzsek		
H16	vad típus	DSM428, ATCC17699
HF338	H16, $\Delta hypD$	Dernedde és mts. (1996)
HF340	H16, $\Delta hypC$	Dernedde és mts. (1996)
Plazmidok		
pBluescript KS,SK+/-	<i>lacZ'</i> , ColE1 <i>ori</i> , f1 <i>ori</i> , Ap ^r	Stratagene
pBluescribe 19+	<i>lacZ'</i> , ColE1 <i>ori</i> , f1 <i>ori</i> , Ap ^r	Stratagene
pBK-CMV	<i>lacZ'</i> , pUC <i>ori</i> , f1 <i>ori</i> , Neo ^r	Stratagene
pET32a(+)	<i>lacI</i> , pBR322 <i>ori</i> , f1 <i>ori</i> , Ap ^r	Novagen
pHRP309	IncQ, <i>mob</i> ⁺ , Gm ^r	Parales és Harwood (1993)
pRK415	RK2 alapú, széles gazdaspecifitású plazmid, Tc ^r	Keen és mts. (1988)
pBSP-	pBluescribe19+ <i>Pst</i> I hasító hely nélkül	Takács és mts., (2001)
pTERP	<i>tetR</i> promotert és RBS-t tartalmazó pBSP-, Ap ^r	Takács és mts., (2001)
ptLHDP	<i>T. litoralis hypD</i> génről készült 0,3 kb hosszú PCR fragment, pBluescribe 19+ <i>Hinc</i> II helyen	Takács és mts., (2001)
pLhyp	7,5 kb <i>Eco</i> RI <i>T. litoralis</i> genomi DNS fragment (<i>dapA</i> , <i>hypCD</i> , <i>aat</i>) pBK-CMV, Neo ^r plazmidban	Takács és mts., (2001)
pHCD5	3,5 kb <i>Bgl</i> III- <i>Eco</i> RI <i>T. litoralis</i> genomi DNS fragment (<i>hypCD</i> , <i>aat</i>) pBtSK+, Ap ^r plazmidban	Takács és mts., (2001)
pHCD6	1,9 kb <i>T. litoralis</i> genomi DNS <i>Sac</i> I- <i>Eco</i> RI fragment (<i>aat</i>) pBtKS+, Ap ^r plazmidban	Takács és mts., (2001)
pHCD11	1,6 kb <i>T. litoralis</i> genomi DNS <i>Xba</i> I- <i>Sph</i> I fragment (<i>hypCD</i>) pBS19+, Ap ^r plazmidban	Takács és mts., (2001)
pTHD	<i>T. litoralis hypD</i> gén pTERP, Ap ^r plazmidban	Takács és mts., (2001)

pTHC	<i>T. litoralis</i> <i>hypC</i> gén pTERP, Ap ^r plazmidban	Takács és mts., (2001)
pHTHD	<i>T. litoralis</i> <i>hypD</i> gén <i>tetR</i> promoterrel és RBS-sel pHRP309, Gm ^r plazmidban	Takács és mts., (2001)
pHTHC	<i>T. litoralis</i> <i>hypC</i> gén <i>tetR</i> promoterrel és RBS-sel pHRP309, Gm ^r plazmidban	Takács és mts., (2001)
pHypC	<i>hypC</i> gén pBS19+, Ap ^r plazmidban	jelen dolgozat
pLHU1/1	0,4 kb hosszú <i>Pst</i> I-AccI <i>T. litoralis</i> genomi DNS fragment pBtSK+, Ap ^r plazmidban	Rákhely és mts., (1999)
pFhl1	3,3 kb hosszú <i>Eco</i> RI <i>T. litoralis</i> genomi DNS fragment (<i>fhlA,B,C</i>) pBK-CMV Neo ^r plazmidban	jelen dolgozat
pFhl2	0,6 kb hosszú AccI <i>T. litoralis</i> genomi DNS fragment pBtKS+, Ap ^r plazmidban	jelen dolgozat
pFhl3	1,1 kb hosszú AccI <i>T. litoralis</i> genomi DNS fragment pBtKS+, Ap ^r plazmidban	jelen dolgozat
pFhl6	5,3 kb hosszú <i>Eco</i> RI-XbaI <i>T. litoralis</i> genomi DNS fragment (<i>fhlA,B,C,D</i>) pBtSK+, Ap ^r plazmidban	jelen dolgozat
pFhl7	1,9 kb hosszú XbaI-PstI <i>T. litoralis</i> genomi DNS fragment pBtSK+, Ap ^r vektorban	jelen dolgozat
pFhl10	0,3 kb hosszú BamHI-XbaI <i>T. litoralis</i> genomi DNS fragment pBtSK+, Ap ^r plazmidban	jelen dolgozat
pFhl17	5,4 kb hosszú BamHI-EcoRV <i>T. litoralis</i> genomi DNS fragment (<i>fhlD',E,F,G,H,orf1',3'</i>) pBtKS-, Ap ^r plazmidban	jelen dolgozat
pET32a+ <i>fhlB</i>	<i>fhlB</i> gén egy darabja pET32a(+) expressziós vektorban	jelen dolgozat

3.1. táblázat A munka során használt törzsek és plazmidok.

primer neve	primer szekvencia
hypD01	5' GTTGTGGCTGGCTTTGAGCC 3'
hypD02	5' TCCTCTAAGGACTGCCCCACA 3'
RP1TET01	5' TGCAGCTTGACACTTTATCACTG 3'
TLHYPPE	5' GAACTATAACGTAATCACCAACTTTAACGTCC 3'
TLHC01	5' ATGTGTTTAGCAATGCCCCG 3'
TLHC02R	5' TCACTCCTCCACGAGTTTC 3'
TLHYPD01	5' ATGGAACCTTCGATTTTCAAG 3'
fhl02N	5' ACTGCTGCTGAGCCTGATTC 3'
fhl03R	5' TCAGTGGTGTAATAGAGAC 3'
fhl805	5' CCTTTATGATGCCGTCAA 3'
fhl806	5' GAGCCTGATTCTGGTGGA 3'
fhl8frC1	5' CCTCACCACCTCTAGGTAGT 3'
fhl05	5' CCAGTCGTCAGGAAGTATCA 3'
fhl10	5' GGAGCAATATGGTTCGAGAG 3'
prc2pcp	5' CTCATCGAGACATCCGAAC 3'

3.2. táblázat A munka során használt primerek nukleotidsorrendje.

4. Eredmények és tárgyalásuk

4.1. A hidrogenázok érésében szerepet játszó gének vizsgálata *T. litoralis*-ban

Az irodalmi bevezetőben ismertettem, hogy a kisegítő fehérjék egy része specifikus egy adott hidrogenázra, mások az összes – a sejtben jelen lévő – enzim éréséhez szükségesek. Felmerül a kérdés, hogy ezek a pleiotróp hatású fehérjék heterológ gazdában lévő más hidrogenázok poszttranszlációs érését is képesek-e katalizálni. Az irodalomban egy példát találtunk ilyen jellegű vizsgálatokra, ahol kimutatták, hogy a *Thiocapsa roseopersicina* BBS HypF fehérje kicserélhető a *Rhodobacter capsulatus* illetve a *R. eutropha* HypF enzimeivel, viszont nem képes helyettesíteni az *E. coli* HypF fehérjét (Fodor és mts, 2001).

A hipertermofil hidrogenázok heterológ termeltetéséhez elengedhetetlenül szükséges az az ismeret, hogy a hipertermofil illetve a potenciális heterológ gazda hidrogenáz enzimeinek érési folyamatai mennyire kompatibilisek egymással. Ezekre a kérdésekre kerestem a választ a következő fejezetekben leírtak szerint.

4.1.1. A *hypCD* géneket tartalmazó genomi régió izolálása *T. litoralis*-ból

Munkám első lépésének célja az volt, hogy kimutassam a mezofil mikroorganizmusokban már ismert, a hidrogenázok éréséhez szükséges fehérjéket kódoló gének jelenlétét *T. litoralis*-ban. A kísérletek idején még nem álltak rendelkezésre olyan genomi adatok, amelyek alapján ezeket a géneket számítógéppel azonosítani lehetett volna. A *hypD* gént, ami egy konzervált, pleiotróp fehérjét kódol, eddig minden [NiFe] hidrogenázt tartalmazó mikroorganizmusból sikerült izolálni. Általában más, a hidrogenázok bioszintézisében szerepet játszó fehérjéket kódoló génekkel egy operonban helyezkedik el a genomban.

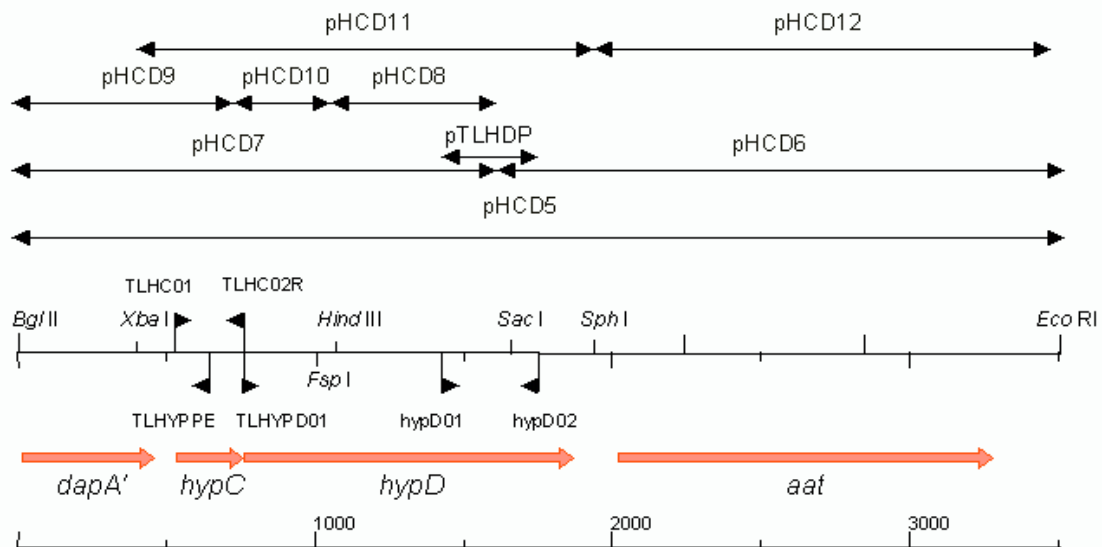
A már ismert HypD fehérjék aminosav sorrendjének összevetése alapján (4.1 ábra) két konzervált régióra tervezett specifikus primer párral (*hypD01*, *hypD02*) amplifikáltam ki egy 0,3 kb hosszú *T. litoralis* genomi régiót. A felszaporított fragmentum klónozást követő (pTLHDP) szekvencia analízise igazolta, hogy egy *hypD* típusú géndarabot sikerült izolálni.

mbtahypd	P G H V S T I I G M	K P Y E P F S R D Y	N I P Q V I A G F N	207
mjhypd	P G H V S T I T G L	K P Y Y G L C E K Y	K A P M V V A G F E	218
phhypd	P G H V S T I I G V	K G W V Y L T E K F	G I P Q V V A G F E	225
aleuhypd	P A H V S I V I G T	R P Y E H F S R E Y	G K P V V I A G F E	230
brjahypd	P A H V S T I I G T	A P Y E F F A E E F	G K P V V I A G F E	197
echypd	P G H V S M V I G T	D A Y N F I A S D F	H R P L V V A G F E	228
konszenzus	P G H V S T I I G -	- P Y - - - - -	- P - V - A G F E	240
				└──────────┘
mbtahypd	P L D I L M A V Y M	I L R Q I D R G E A	K V E N E Y K R A V	237
mjhypd	P I D V L M A I I M	I L K Q V I S G E A	K V E N E Y I R A V	248
phhypd	P V D V L L A I L T	L I R L V K R G E A	K I V N E Y N R A V	255
aleuhypd	P L D V M Q A I L M	L V R Q V N S G R A	E V E N E F V R A V	260
brjahypd	P L D M M Q A I L M	L V R Q V N E H R H	E V E N Q Y S R A V	227
echypd	P L D L L Q G V V M	L V Q Q K I A A H S	K V E N Q Y R R V V	258
konszenzus	P L D - L - A I - M	L - R Q V - - G - A	K V E N E Y - R A V	270
				→
mbtahypd	K P E G N L K A Q K	V M D E V F K V T .	E R E W R G F P V I	266
mjhypd	K P E G N V L A Q K	I I N E V F E S I .	D V P W R G F P V V	277
phhypd	K W E G N V K A Q E	L I R K F F E V K .	D A K W R A L G I I	284
aleuhypd	T R D G N E S A Q A	M V S E V F E L R P	S F E W R G L G E V	290
brjahypd	T R D G N L R A K E	E V S D I F E L R D	Q F E W R G L G Q V	257
echypd	P D A G N L L A Q Q	A I A D V F C V N G	D S E W R G L G V I	288
konszenzus	- - - G N - - A Q -	- - - V F E - - -	- - E W R G L G - -	300
mbtahypd	P E S V Y E I R D E	F S E F N A R E K F	D I E V E D T V D T	296
mjhypd	K N G G F G L R E K	Y K K F D I Y E H E	D I P . E I K E K I	306
phhypd	P K S G L E L R K E	W K E L E I R N Y Y	D P D V P K L P D L	314
aleuhypd	P Y S A L R I R A Q	F A R F D A E Q R F	D L R Y R P V P D N	320
brjahypd	P Y S G L K L K R A	Y A K Y D A E V R F	D M N E L R V D D N	287
echypd	E S S G V H L T P D	Y Q R F D A E A H F	R P A P Q Q V C D D	318
konszenzus	P - S G - - L R - -	- - - F D A - - - F	D - - - - - D -	330
mbtahypd	P A G C I C G A V L	R G V A R P E E C K	L F K N E C T P T S	326
mjhypd	P K G C I C D K I L	R G E K L P T D C P	L F G T V C T P L N	336
phhypd	E K G C L C G A V L	R G L A L P T Q C P	H F G K T C T P R H	344
aleuhypd	K A C . E C G A I L	R G V K K P T D C K	L F A T V C T P E N	349
brjahypd	P A C . E C G A I L	R G V K K P V D C K	L F G T V C T P E T	316
echypd	P R A . R C G E V L	T G K C K P H Q C P	L F G N T C N P Q T	347
konszenzus	P - - - C G A - L	R G - - - P - - C -	L F G - - C T P - -	360
				←
mbtahypd	P I G A C M V S R E	G T C N I A Y R Y S	S F	348
mjhypd	P V G S C M V S D E	G T C R I F Y K Y R	R I	358
phhypd	P I G P C M V S Y E	G T C H I F Y K Y G	A L F	367
aleuhypd	P M G S C M V S S E	G A C A A H Y S Y G	R F K D I P L V A A	379
brjahypd	P M G S C M V S S E	G A C A A H W T Y G	R F R D H Q Q R R A	346
echypd	A F G A L M V S S E	G A C A A W Y Q Y .	R Q Q E S E A . . .	373
konszenzus	P - G - C M V S - E	G - C - - Y - Y -	R - - - - - - -	390

4.1. ábra Különböző fajokból származó HypD fehérjék aminosav sorrendjének összevetése.

A PCR során alkalmazott hypD01 és hypD02 primerek elhelyezkedését nyilak jelölik. Az ábra nem a teljes fehérje szekvenciát csak a számunkra érdekes C-terminális régiót mutatja.

Az ábrán használt rövidítések: mbta: *Methanothermobacter thermoautotrophicus*, mj: *Methanococcus jannaschii*, ph: *Pyrococcus horikoshii*, aleu: *Alcaligenes eutrophus* (*Ralstonia eutropha*), brja: *Bradirhizobium japonicum*, ec: *Escherichia coli*.



4.2. ábra A *T. litoralis* *hypC* és *hypD* géneket kódoló genom régiójának restrikciós endonukleáz hasítási térképe, a nukleotidsorrend meghatározás során használt szubklónok, és a kísérletekben felhasznált primerek pozíciója.

A fragmentumot megjelöltem és a *T. litoralis* genomi DNS-éből készült *EcoRI* fágkönyvtárból plakkhibridizációt követően a pozitív jelet mutató fágok közül egyet kiválasztottam. Ebből ugrasztottam a 7,5 kb hosszú genomi régiót tartalmazó fagemidet (pLhyp). A teljes szakaszból egy 3,5 kb hosszú régió (pHCD5) szekvenciáját szubklónoztam követően mindkét szálon meghatároztam. A szubklónozás menete a 4.2. ábrán látható. A régióban négy nyitott leolvasási keretet azonosítottam. Ezek közül a két középső *orf* szekvenciájából származtatott feltételezett fehérjék hasonlóságot mutatnak már ismert HypC és HypD fehérjékkel. A másik két *orf* a hidrogenáz bioszintézis szempontjából irreleváns fehérjéket kódoló génekhez hasonlóak. Az első *orf* származtatott terméke 35-40%-os azonosságot mutat bakteriális és archaebakteriális dihidropikolinát szintáz fehérjékkel (*DapA*), míg a negyedik *orf* olyan fehérjét kódol, amely 84%-ban azonos *Pyrococcus furiosus* alanin aminotranszferáz enzimével (*Aat*) (gb:AAF65616). Az eredmények azt mutatják, hogy *T. litoralis* esetében a kisegítő gének elszórtan helyezkednek el a genomban. A többi *hyp* gént nem izoláltuk, mert a közeli rokon fajok időközben elkészülő genomszekvenálásai feltárták, hogy ezekben a hipertermofil törzsekben is megtalálható a [NiFe] hidrogenázok éréséhez szükséges összes gén, amelyeket mezofil mikroorganizmusokból már ismerünk, és ez egy nagyon hasonló, vagy azonos érési útvonal meglétét bizonyítja.

4.1.2. A *hypC* és *hypD* géntermékek jellemzése

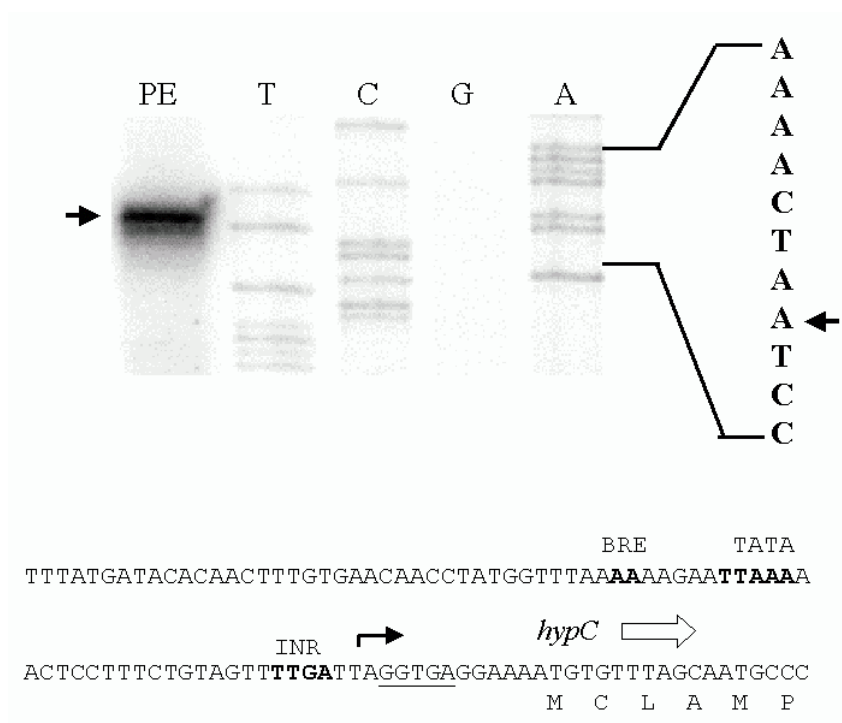
A nukleotidsorrendből származtatott *T. litoralis* HypC fehérje 75 aminosav hosszú, *E. coli* HypC-vel 29%-os (gb:AAC75770), *R. eutropha* ugyanazon fehérjéjével 43%-os (gb:AAP85771), és általában 30%-os azonosságot mutat mezofil mikroorganizmusok HypC fehérjéivel. A HypC egy chaperon fehérje, amely tartalmaz egy konzervált M-C-(L/I/V)-(G/A)-(L/I/V)-P motívumot, ami a hidrogenáz nagy alegység egyik ciszteinjével lép kölcsönhatásba az érés során. (Magalon és Böck, 2000b). Ez a motívum a *T. litoralis* HypC fehérjében is megtalálható.

Az *in silico* lefordított *T. litoralis* HypD fehérje 38 illetve 39%-os azonosságot mutat *E. coli* (gb:AAN81738) illetve *R. eutropha* (gb:AAP85772) megfelelő géntermékével, és 37-45%-os azonosság figyelhető meg egyéb, mezofil eredetű HypD fehérjék aminosav sorrendjével.

Mind a bakteriális mind archaeobakteriális eredetű HypD fehérjék aminosav szekvenciája tartalmaz néhány erősen konzervált motívumot. Közel az N-terminálishoz található a CGxHxH motívum (motívum 1), melyet CPVC követ (motívum 2) és végül a fehérje C-terminális végén található négy cisztein: Cx₁₂Cx₆Cx₁₆C elrendezésben (motívum 3). Az *E. coli* HypD hármass motívum ciszteinjeinek mutagenézise a fehérje destabilizációjához vezetett, az egyes és kettes motívum ciszteinjeinek lecserélése pedig inaktívvá tette a fehérjét, így mindhárom esetben hiányzott a sejtekből a hidrogenáz aktivitás (Blokesch és Böck, 2006). A három fent említett motívum mellett további két konzervált régió is található a fehérje középső régiójában: GFETT és PxHVSx₃G. Ezen motívumok mindegyike megtalálható az izolált *hypD* gén által kódolt fehérjében.

4.1.3. A transzkripció iniciációs hely, a transzkripcióhoz szükséges elemek

A primer extenzió kísérletek megmutatták, hogy a transzkripció iniciációs pont 12 bázispárra található 5' irányban a *hypC* startkodonjától. A *hypCD* géneket tipikus archaeobakteriális promoter előzi meg. A -26/-27-es régióban TATA box (korábban Box A), a transzkripció starthely közelében INR (initiator element) szekvencia (korábban Box B), a -33/-34 pozícióban a BRE (transcription factor B recognition element) régiót alkotó két adenin jelölhető ki (Soppa, 1999). A *hypC* és *hypD* géneket tizenkét nukleotid választja el egymástól, és valószínűleg egy transzkripció egységet alkotnak. A *hypD* gén stop kodonja után 9 nukleotiddal egy T-gazdag régió található, ami transzkripció terminációs szignálként szolgálhat (Brown és mts., 1989).



4.3. ábra A *hypCD* gén promoter régiója és a transzkripció starthely térképezése.

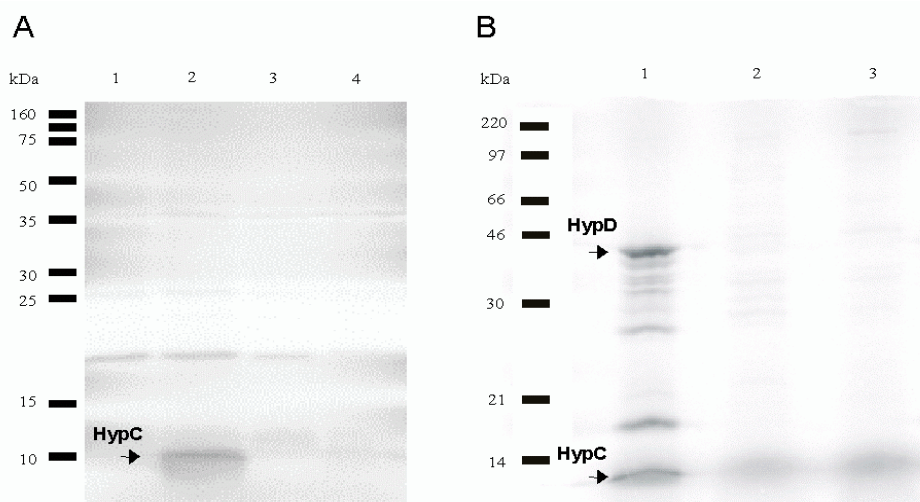
A transzkripció starthelyét nyíl, a riboszómális kötőhelyet aláhúzás, a promoter régió elemeit vastagon szedett betűk jelölik. (PE: primer extenzió)

4.1.4. A *hypC* és *hypD* gének transzlációja

A *hypC* és *hypD* gének előtt tipikus riboszómális kötőhelyek találhatók (ld. 4.3. ábra), amelyek igen hasonlítanak a baktériumok Shine-Dalgarno szekvenciáira. Azonban a *hypC* gént megelőző riboszóma kötőhely csupán két nukleotidra van a transzkripció iniciációs helytől (4.3. ábra), ami a baktériumok esetén túl rövidnek számítana. Ez nem túl nagy távolság, de van példa arra, hogy a transzkripció starthely ilyen közel helyezkedik el a riboszómális kötőhelyhez. Egy hasonlóan rövid, négy bázispáros szakasz előzi meg a *P. furiosus lexA* génjének riboszómális kötőhelyét (Brinkman és mts., 2000), ami arra mutat, hogy a 5' nem-transzlálódó régió megléte nem általános követelmény az archaebakteriális transzkriptumok esetén. Érdekességgént megemlítem, hogy a legújabb eredmények azt mutatják, hogy számos olyan archaebakteriális gén van, ahol a transzláció és a transzkripció kezdőpontja egybeesik (Londei, 2007).

Annak érdekében, hogy kimutassuk, a *T. litoralis hypC* és *hypD* génjeinek transzlációs szignáljai funkcionálisak *E. coli*-ban, a HypC és HypD fehérjéket radioaktívan jelölve termeltettem *E. coli* BL21(DE3) törzsben a pHCD11 és pHypC klónokat használva fel, a T7 promoter/T7 RNS polimeráz alapú expressziós rendszerben (Tabor és Richardson,

1985). A fehérjét SDS-PAGE után autoradiográfiásan detektáltam. A kapott fehérjék mérete megfelel a várt molekuláris tömegnek: 8 és 42 kDa (4.4. ábra). Ebből azt a következtetést vontuk le, hogy az *E. coli* transzlációs apparátusa képes a gének transzlációs szignáljait felismerni és a géneket polipeptidekké átírni. Az eredmények arra is utalnak, hogy a keletkező polipeptidok intakt, szolubilis formában képződnek, ellenállnak a gazdasejt proteázainak és reményeink szerint aktívak.



4.4. ábra A *hypC* és *hypCD* gének heterológ expressziója a T7 promotor/T7 RNS polimeráz alapú expressziós rendszerben.

A. 1. sáv: pBS19+ *E. coli* BL21(DE3) törzsben, 0,4mM IPTG-vel indukálva 2. sáv: pHypC *E. coli* BL21(DE3) törzsben 0,4mM IPTG-vel indukálva 3. sáv: pBS19+ *E. coli* BL21(DE3) törzsben 4. sáv: pHypC *E. coli* BL21(DE3) törzsben. A fehérjék S^{35} izotóppal voltak jelölve, és 12%-os SDS-poliakrilamid gélen lettek elválasztva.

B. 1. sáv: pHCD11 *E. coli* BL21(DE3) törzsben, 0,4mM IPTG-vel indukálva; 2. sáv: pBS19+ *E. coli* BL21(DE3) törzsben, 0,4mM IPTG-vel indukálva; 3. sáv: pBS19+ *E. coli* BL21(DE3) törzsben. A fehérjék S^{35} izotóppal voltak jelölve, és 12%-os SDS-poliakrilamid gélen lettek elválasztva.

4.1.5. A *hypC* és *hypD* gének funkcionális vizsgálata heterológ gazdában

A fenti fejezetekből kiderül, hogy a hipertermofil archaeobaktériumokban is a mezofilekre jellemző hidrogenáz érési folyamat feltételezhető, így elképzelhető, hogy képesek a megfelelő mutáns háttérrel rendelkező gazda fehérjét helyettesíteni. Az archaeobaktériumok transzkripcióis sajátosságai az eukariótákra, míg a transzláció mechanizmusa, a transzlációs szignálok inkább az eubaktériumokra hasonlítanak. Az előző

fejezetben láttuk, hogy a HypCD fehérjét az *E. coli* képes termelni, amennyiben valamilyen módon biztosítjuk a bakteriális rendszernek megfelelő transzkripciós szignálok jelenlétét (T7 promoter/T7 RNS polimeráz rendszer). Azonban ez a transzkripció komplementációs kísérletekhez nem használható, mert túl erős az expresszió és ez negatívan befolyásolhatja az érési folyamatokat. Ezért a tetraciklin represszor gén promoterét alkalmaztam, amelyet már *E. coli*-ban sikerrel használtak komplementációs kísérletekben (Fodor és mts., 2001) és viszonylag gyenge transzkripciót biztosít.

Olyan konstrukciókat hoztam létre, amelyekben a vizsgált gének expresszióját a tetraciklin represszor gén regulációs elemei biztosították. A *tetR* gén tetraciklin jelenlétében indukálódik, annak hiányában egy bazális alacsony szintű transzkripció figyelhető meg, ami biztosítja a *tetA* és *tetR* gének TetR fehérje általi represszióját. Mind a két gén expresszióját a tetraciklin indukálja (Altenbuchner és mts., 1983).

A *hypC* és *hypD* heterológ funkcionális tesztjét *E. coli* illetve *R. eutropha* mutáns törzseiben vizsgáltam. *E. coli* a legáltalánosabban használt gazdasejt heterológ expressziós kísérletekben és több hidrogenázt is tartalmaz. Azért esett a választásunk *R. eutropha*-ra, mert membrán kötött hidrogenáza mellett tartalmaz a *T. litoralis* szolubilis hidrogenázaival rokon NAD-redukáló hidrogenázt is.

A HypC-vel történő komplementációs kísérleteket az *E. coli* DHP-C törzsben a pTHC, *R. eutropha* HF340 törzsében a pHTHC plazmidokkal végeztem. *R. eutropha*-ban mind a szolubilis enzim, mind a membrán kötött enzim, *E. coli*-ban csak a 3-as hidrogenáz aktivitását vizsgáltam. Egyik esetben sem történt kimutatható komplementáció.

A *hypD* komplementáció során a pTHD és pHTHD plazmidokat használtam *E. coli* DHP-D illetve *R. eutropha* HF338 törzsekben. *E. coli* esetében nem találtam komplementációt. *R. eutropha*-ban a membrán kötött hidrogenáz nem mutatott hidrogenáz aktivitást, míg a szolubilis enzim gyenge, de szignifikáns ($2 \pm 0,5\%$) aktivitást mutatott a vad törzshöz (H16) viszonyítva. Ez arra utal, hogy a *T. litoralis* HypD képes részt venni a szolubilis NAD-redukáló hidrogenáz érésében. Mivel kis mértékű komplementáció megfigyelhető volt, feltehető, hogy a fehérje annak ellenére, hogy egy mezofil gazdában termeltettük, megfelelő konformációt volt képes elérni és aktív volt. Az is elképzelhető, hogy a termelődő fehérjéknek csak egy része volt aktív. Egy másik lehetséges magyarázat az alacsony komplementációra az, hogy a fehérjék érése során igen fontos, hogy az egyes komponensek megfelelő arányban legyenek jelen a folyamatban és ezt a kísérletben nem sikerült eltalálni.

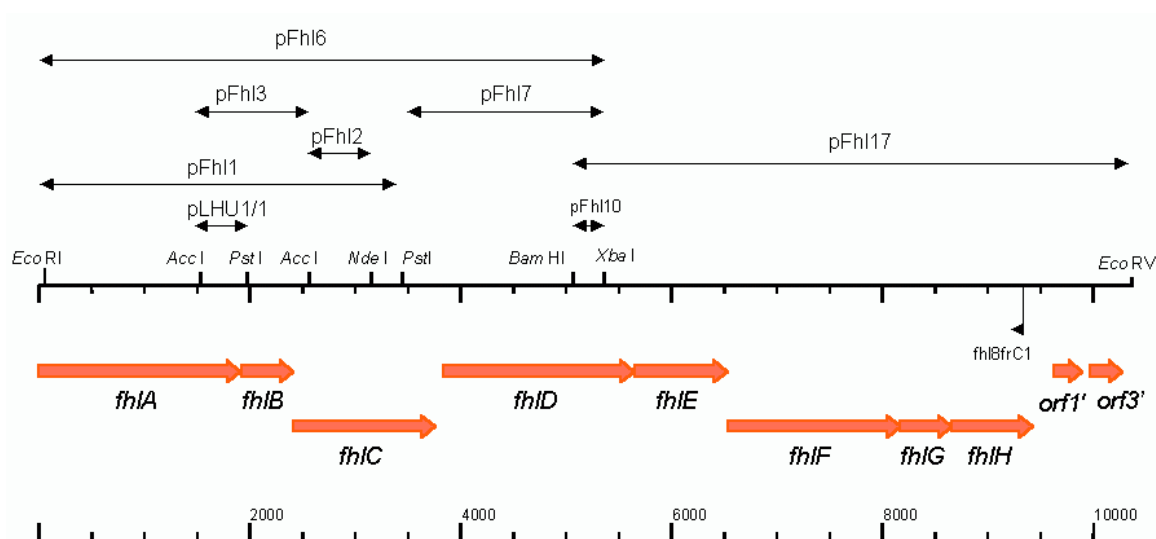
Feltételezzük, hogy szabályozható promoterek segítségével, és ily módon a megfelelő sztöchiometria beállításával jobb eredmények is elérhetők heterológ gazdában történő expresszió esetén.

4.2. Membrán kötött hidrogenáz vizsgálata *T. litoralis*-ban

4.2.1. A membrán kötött hidrogenázt kódoló genom régió izolálása *T. litoralis*-ból

A *T. litoralis* két szolubilis hidrogenáza közül az 1-es génjeit csoportunkban izolálták (Rákhely és mts., 1999). Ezen génklaszter promoter régiójának vizsgálata során találtuk meg egy másik operon első két génjét, melyek a hidrogenáz-1 HyhB alegységét kódoló géntől 5' irányban találhatók 214 nukleotidra, és a *hyhBGDA* génklaszter génjeivel ellentétes orientációjúak. A felfedezett két gén által kódolt fehérjék különböző mikroorganizmusok formát-dehidrogenázainak α és β alegységével mutattak hasonlóságot. Mivel a formát hidrogénliázok esetén a formát-dehidrogenáz működése kapcsolódik a hidrogenázokhoz (Sawers, 2005), érdemesnek gondoltuk a tőlük 3' irányban található genom régiót is megvizsgálni.

A genom régió izolálásának pontos menete az Anyagok és módszerek fejezetben található. A teljes kb. 10,5 kb hosszú genom régió, a szubklónok és az azonosított gének elrendeződése a 4.5. ábrán látható.



4.5. ábra *T. litoralis* *fhl* operon izolálása és nukleotidsorrend meghatározása során alkalmazott főbb klónok és az azonosított, feltételezett gének pozíciója.

4.2.2. Az *fhl* operon

Az összesen 10474 bp hosszú genom szakaszon összesen tíz olyan nyitott leolvasási keret található, melyek *in silico* származtatott géntermékei hasonlítanak az adatbázisokban előforduló olyan fehérjékhez, amelyekhez sikerült már valamilyen funkciót társítani. Ezek közül nyolc elrendeződésük alapján egy operonban helyezkedik el.

Az egyetlen olyan mikroorganizmus melyben hasonló felépítésű operont találunk, a *Pyrococcus abyssi*. Az említett mikroorganizmus teljes genom szekvenciája meghatározásra került (Cohen és mts., 2003) és az említett operon az annotáció során a hidrogenáz-4 illetve formát hidrogénliáz nevet kapta, de eddig nincs az irodalomban adat arra vonatkozóan, hogy fehérje szinten is megvizsgálták volna az operon által kódolt feltételezett fehérjekomplexet. A *T. litoralis* közeli rokonaiban, mint pl. a legalaposabban tanulmányozott *P. furiosus*-ban nem található hasonló operon, igaz a genomban szétszórtan megtalálhatók hasonló fehérjéket kódoló gének.

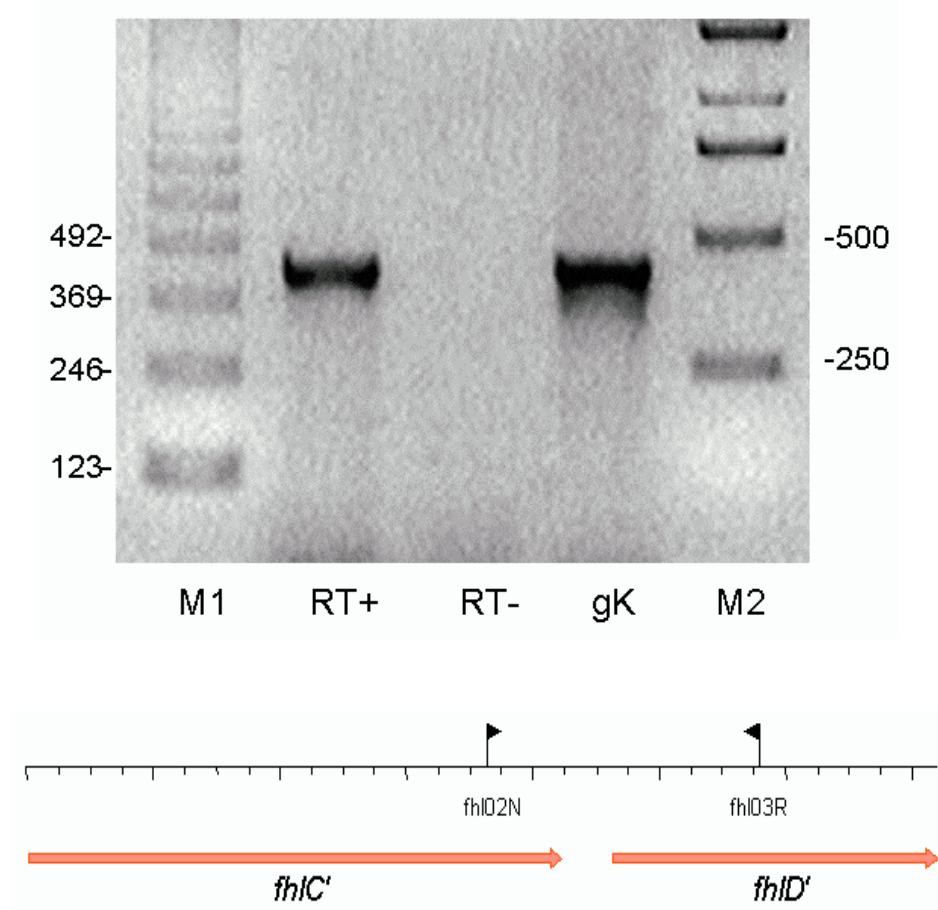
A nukleotid sorrendből származtatott aminosav sorrend alapján adatbázisokból nyerhető adatokat a következő pontban taglalom. Az operonhoz nem tartozó két feltételezett gén (*orf 1'*, *orf 3'*) által kódolt polipeptidek Na⁺/H⁺ antiporterek alegységeivel mutatnak hasonlóságot.

A *fhlA* gén előtt tipikus archaebakteriális promoter található TATA box, INR (initiator element) és BRE (transcription factor B recognition element) elemekkel (Soppa, 1999) (4.6. ábra).



4.6. ábra A *T. litoralis fhl* operon promoter régiójának képe. Az archaebakteriális promoterekre jellemző TATA, INR és BRE régiókat vastagon szedett betűkkel, a riboszómális kötőhelyet aláhúzással jelöltem. **B** *T. litoralis fhl* operon feltételezett transzkripció terminációs szignálja. A hairpin-loop képzésre alkalmas szekvenciát aláhúzással jelöltem.

Mind a nyolc *fhl* gént konzervált riboszómális kötőhely előzi meg (Brown és mts., 1989). A legtöbb esetben az egymást követő gének utolsó illetve első egy-két nukleotidja azonos, azaz a gének átfednek vagy csak két-három bázispáros hézag található köztük. Ebből az elrendezésől arra következtethetünk, hogy a nyolc gén transzkripciót egységet alkot. Egyetlen egy helyen *fhlC* és *fhlD* között található nagyobb, 78 bp hosszú távolság. Annak ellenőrzésére, hogy itt megszakad-e a transzkripció RT-PCR kísérletet végeztünk a *fhl03R*-*fhl02N* primerpárral, ahol egy 417 bp hosszú terméket vártam. Ennek eredménye, mely azt mutatta, hogy a *fhlC* és *fhlD* gének együttesen íródnak át, a 4.7. ábrán látható. Egy másik kísérletben az operon végére tervezett *fhl8frC1* primerrel készített cDNS-en végeztem PCR-t az operon különböző régióira tervezett primerekkel, ennek eredménye is azt mutatta, hogy az *fhlA-H* gének egy transzkripten helyezkednek el (nem bemutatott adat).



4.7. ábra *T. litoralis* cDNS-en *fhl03R*-*fhl02N* primerpárral végzett RT-PCR eredménye. A kép két oldalán a markersávok mérete van feltüntetve bázispárban. M1: 123 bp-os DNS marker (IRL); RT+: reverz transzkriptáz jelenlétében végzett reakció; RT-: reverz transzkriptáz nélkül végzett reakció; gK: genomi DNS-en végzett kontrol kísérlet; M2: GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas). A termékeket 2 %-os agaróz gélen választottam el.

Az operon utolsó génje (*fhlH*) után található egy hairpin-loop struktúra képzésére alkalmas 5 nukleotid által elválasztott palindrom szekvencia, amit egy oligo(dT) régió követ (4.6. ábra). Ez jellegzetes transzkripció terminációs szignálja sok archaea fehérje kódoló génjének (Brown, 1989).

4.2.3. A *fhl* gének termékeinek részletes leírása

Az *fhl* operon géntermékeinek egyes tulajdonságai a 4.1. táblázatban találhatók.

FhIA. Az alegység 33%-os azonosságot mutat *M. formicicum* (sp:P06131) és 29%-os azonosságot *E. coli* formát-dehidrogenázának (Fdh-H) α alegységével (sp:P07658), *P. abyssi* formát-dehidrogenázának megfelelő alegységével (emb:CAB50383) 33%-os az azonosság. A származtatott aminosav sorrend alapján a fehérje egy [FeS] klaszter kötőhelyet és egy molibdopterin kofaktor kötőhelyet tartalmaz, azonban nagy valószínűséggel a fehérjében nem molibdén, hanem wolfram található, ahogy azt más pterin kofaktort tartalmazó hipertermofil enzimek esetében találták (Kletzin és Adams, 1996). FhIA formát-dehidrogenázok mellett nitrát-reduktázokkal mutat hasonlóságot az adatbázis keresések során, amelyek szintén a molibdopterin oxidoreduktáz család tagjai.

FhIB. A származtatott aminosav sorrend alapján ez az alegység 55%-os azonosságot mutat *P. abyssi* formát-dehidrogenázának vas-kén fehérje rokon alegységével (emb:CAB50382). A többi találat a különféle molibdopterin oxidoreduktázok, köztük formát-dehidrogenázok vas-kén kötő alegysége közül kerül ki, melyekkel az azonosság 30-36% között van. A fehérjében két ferredoxin típusú CxxCxxCxxxC motívum van, ami két [4Fe-4S] klaszter jelenlétére utal a fehérjében. FhIB az *E. coli* 3-as hidrogenázának hycB alegységével 32%-os azonosságot mutat, amelynek a formát-dehidrogenáz és a hidrogenáz közti elektron transzportban tulajdonítanak szerepet (Meuer és mts., 1999).

gén	feltételezett funkció	<i>in silico</i> transzlált termék mérete (aminosav)	molekula súly (kDa)	membrán hélixek száma ^a
<i>fhlA</i>	formát-dehidrogenáz α	637	71,6	
<i>fhlB</i>	e- transzport fehérje	165	18,5	
<i>fhlC</i>		448	49	13
<i>fhlD</i>		603	65,7	15
<i>fhlE</i>		293	32	7
<i>fhlF</i>	hidrogenáz nagy alegység	546	62,4	
<i>fhlG</i>	e- transzport fehérje	165	18,7	
<i>fhlH</i>	hidrogenáz kis alegység	256	29,6	

4.1. táblázat A *T. litoralis* membrán kötött hidrogenáz alegységeinek feltételezett tulajdonságai.

a: Tusnády és Simon (2001)

FhIC,D,E. Az *fhICDE* gének a HMMTOP predikciós program alapján erősen hidrofób karakterű, membránt átérő hélixeket tartalmazó fehérjéket kódolnak. FhIC, D és E sorrendben 13, 15 illetve 7 transzmembrán hélixet tartalmaz. Szekvencia analízis alapján az FhIC és D az *E. coli* Nuo komplex L és M, FhIE a Nuo komplex H alegységével, illetve különböző NADH dehidrogenázok, Na(+)/H(+) antiporterek és membrán kötött hidrogenázok alegységeivel mutatnak hasonlóságot. A *P. abyssi* 4-es hidrogenáz D (emb:CAB50381), B (emb:CAB50380), és C (emb:CAB50379) alegységeivel sorrendben 56, 36 és 52%-os az azonosság.

FhIF. Az FhIF fehérjében megtalálhatóak a [NiFe] hidrogenázok nagy alegységére jellemző konzervált motívumok. Azonosítható benne az aktív centrumban lévő [NiFe] centrum megkötéséért felelős négy konzervált cisztein (CxxC), kettő az N-, kettő a C-terminális régióban, és szintén azonosítható a fehérje C-terminális végén a DPCxxCxxH/R motívum, ahol az alegység érése során a motívum végén lévő hisztidin vagy arginin után történik a C-terminális vég proteolitikus levágása (4.8. ábra). A fehérje 55%-os azonosságot mutat *P. abyssi* 4-es hidrogenáz G alegységével (emb:CAB50378), míg *E. coli* 3-as hidrogenáz nagy alegységével (HycE) 46%-os az azonosság (emb:CAA35550).

Ha aminosavsorrend összehasonlítást készítettünk különböző eredetű hidrogenázok nagy alegységével, világossá válik, hogy az enzim a 4-es típusú membránkötött energia konzerváló hidrogenázok családjába tartozik, melyek között találjuk a formát hidrogénliáz komplexekben található hidrogenázokat. Azonosítható benne az az N-terminális extenzió, amely ezen csoport formát hidrogénliáz komplexet alkotó hidrogenázainak nagy alegységére jellemző – mint pl. *E. coli* HycE, HyfG –, és aminek a formát-dehidrogenázzal való kölcsönhatásban tulajdonítanak szerepet (Kunkel és mts., 1998).

<i>P. furiosus</i>	HydA	63	R I C S F C S A A H(343x) D P C I S C S V H
<i>P. furiosus</i>	ShyA	58	R I C A I C Y I A H(332x) D P C I S C S V H
<i>D. gigas</i>	HynA	63	R A C G V C T Y V H(455x) D P C I A C G V H
<i>R. rubrum</i>	CooH	61	R V C S L C S N S H(281x) D P C I S C T E R
<i>P. furiosus</i>	MbhL	66	R M C G I C S F S H(304x) D P C L S C T D R
<i>T. litoralis</i>	FhIF	224	R I C G I C G F A H(280x) D P C Y S C T E R

4.8. ábra A [NiFe] klaszter kötő motívum összehasonlítása különböző eredetű hidrogenázok nagy alegységeiben.

FhIG. Ez az alegység vas-kén klasztert tartalmazó hidrogenáz alegységekkel mutat hasonlóságot. *P. abyssi* 4-es hidrogenáz B alegységével (emb:CAB50377) 55%-os, *E. coli*

3-as hidrogenáz vas-kén fehérjével (HycF: gb:ABG70672) 43%-os azonosság figyelhető meg. A fehérjében két ferredoxin típusú CxxCxxCxxxCP motívum van, ami két [4Fe-4S] klaszter jelenlétére utal a fehérjében. FhlG fehérje más hidrogenázokban előforduló megfelelőinek, mint pl. *E. coli* HycF az elektron transzportban tulajdonítanak szerepet.

FhlH. Az FhlH fehérje hidrogenázok kis alegységével mutat hasonlóságot. *P. abyssi* 4-es hidrogenáz kis alegységével (emb:CAB50376) 55%-os, *E. coli* HycG-vel 40%-os az azonosság. Megtalálható benne az összes [NiFe] hidrogenáz kis alegységére jellemző CxxC_nGxCxxxG_mGCPP (n=61-101, m=24-61) konzervált aminosav mintázat, ami egy [4Fe-4S] klasztert köt (4.9. ábra). A fehérje C-terminálisán nem található szignál szekvencia, ami arra utal, hogy a hidrogenáz a membrán citoplazma felőli oldalán helyezkedik el, ahogy azt a többi formát hidrogénliáz esetében is feltételezik. Ez az elrendezés arra enged következtetni, hogy a komplexnek endogén szubsztrátja van.

<i>T. litoralis</i>	FhlH	16	A	C	N	G	C	(62x)	G	x	C	(3x)	G	(37x)	G	C	P	P	R	P
<i>P. furiosus</i>	MbhJ	38	S	C	N	G	C	(62x)	G	x	C	(3x)	G	(24x)	G	C	P	P	R	P
<i>R. rubrum</i>	CoolL	21	S	C	N	G	C	(62x)	G	x	C	(3x)	G	(24x)	G	C	P	P	R	P
<i>D. gigas</i>	HynB	17	E	C	T	G	C	(89x)	G	x	C	(3x)	G	(30x)	G	C	P	P	N	P
<i>D. vulgaris</i>	HynB	17	E	C	T	G	C	(91x)	G	x	C	(3x)	G	(30x)	G	C	P	P	N	P

4.9. ábra A [FeS] klaszter kötő motívumok összehasonlítása különböző eredetű [NiFe] hidrogenázok kis alegységében.

Az *in silico* analízis alapján egy hat alegységből álló membrán kötött hidrogenázt és a hozzá kapcsolódó formát-dehidrogenázt kódoló operont izoláltunk. A hidrogenáz a [NiFe] hidrogenázok négyes csoportjához tartozik. Némi eltérést jelent, hogy míg ezek a hidrogenázok általában minimum négy hidrofil és két hidrofób alegységből állnak (Hedderich, 2004), az általunk izolált operon három hidrofil és három hidrofób alegységből álló hidrogenázt kódol. Igaz, a hat alegységből csak öt mutat hasonlóságot ismert fehérjékkel, ezek a hidrogenáz kis és nagy alegysége, a feltételezett elektron transzport fehérje a két [FeS] klaszterrel, és a két membrán kötött alegység. Ezek a fehérjék az izolált operon által kódolt komplexben is azonosíthatók, a hatodik, ismeretlen funkciójú alegység helyett esetünkben egy hidrofób fehérje található. Mivel egy operonban kódolt a formát-dehidrogenázzal, valószínűleg funkcionálisan kapcsoltak és egy – az irodalomban már jól ismert – formát hidrogénliáz komplexet alkothatnak.

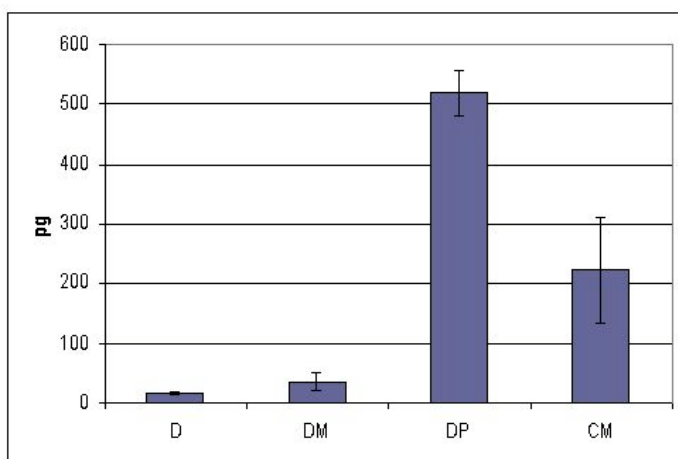
Az általunk feltételezett komplex fiziológias funkciójának felderítésére több stratégiát alkalmaztunk.

1. Az operon transzkripció szintű szabályzásának a vizsgálata különböző növesztési körülmények között.
2. Ellenanyag termeltetés a komplex néhány alegységére, a sejtben való lokalizáció meghatározására, illetve a tisztítási lépések követésére.
3. Formát-dehidrogenáz és hidrogenáz aktivitás kimutatása *T. litoralis* membrán frakcióban.
4. A komplex tisztítása.

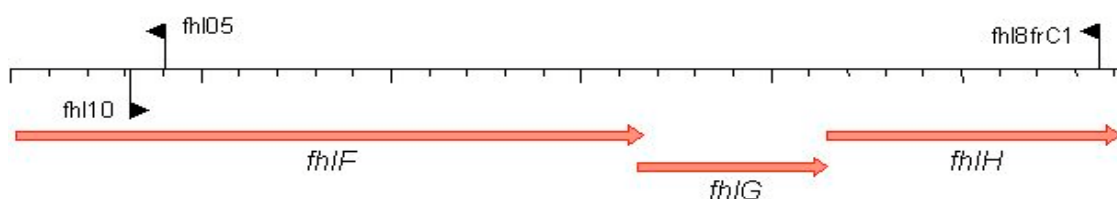
4.2.4. Az *fhl* gének expressziójának transzkripció szintű vizsgálata különböző növesztési körülmények között

Annak kiderítésére, hogy az általunk izolált operon expressziója változik-e különböző növesztési körülmények között, abszolút kvantifikációs reverz transzkripció kapcsolt Real-Time PCR kísérleteket végeztem. Azt reméltem, hogy a kapott eredmények információt szolgáltatnak majd, a komplex lehetséges fiziológiás szerepéről. A kísérlet során komplex tápoldatot (CM), szénforrásként aminosavakat tartalmazó definiált minimál tápoldatot (D), illetve ennek maltózzal (DM) és/vagy peptiddel (DP, DMP) kiegészített változatát használtam.

A 4.10. ábrán látható, hogy az operon a peptidet és aminosavakat is tartalmazó DP tápoldaton mutatja a legnagyobb transzkripció aktivitást, szintén magas ez az érték a peptideket tartalmazó CM tápoldaton, míg igen alacsony a DM és D tápoldat esetén. Ez arra utal, hogy a komplex fiziológiás funkciója a peptid illetve aminosav lebontási útvonalhoz kapcsolt, valószínűleg a folyamat során keletkező fölös redukálóerő eltávolításban játszik szerepet. Minimál tápoldaton (D) ahol csak aminosavak vannak a tápoldatban szénforrásként, a törzs meglehetősen gyenge növekedést mutat. Ennek oka lehet egyrészt az elégtelen aminosav felvétel, ahol ráadásul az esszenciális aminosavak egymással versenyeznek, másrészt az aminosavak sokkal instabilabbak magas hőmérsékleten, mint a peptidek (Rinker és Kelly, 1996). D tápoldatban a sejtek valószínűleg nem jutnak elegendő tápanyaghoz, az aminosavak jó része feltehetően a felépítő folyamatokba kerül, illetve a lebontás során keletkező intermedierekre a glükoneogenezis során van szükség, ez magyarázhatja az *fhl* operon alacsony expressziós szintjét.



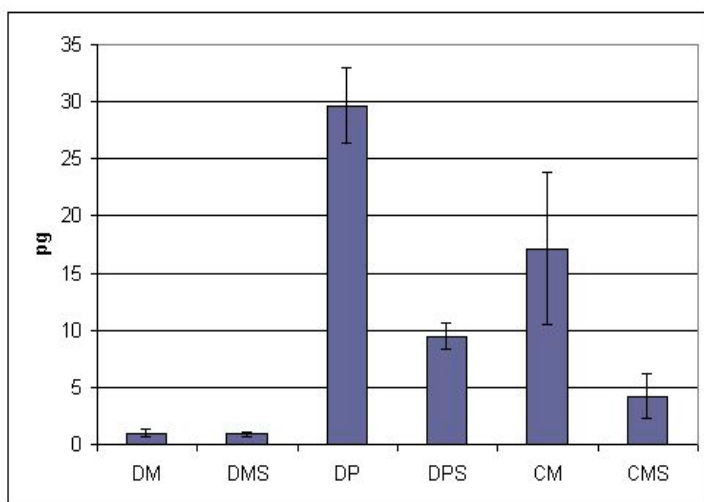
táp	pg
D	15,22 ± 1,91
DM	35,01 ± 13,4
DP	518,95 ± 38,52
CM	220,65 ± 88,8



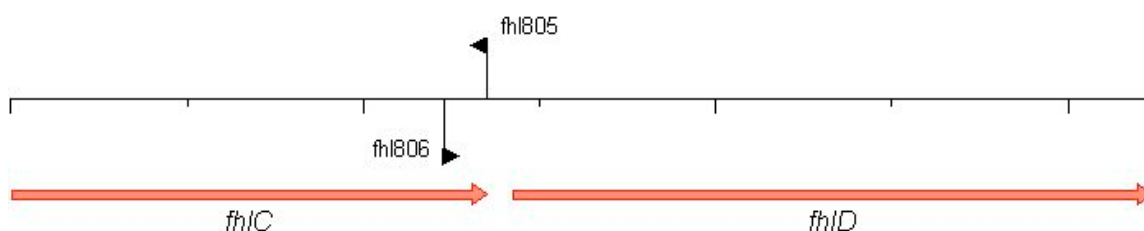
4.10. ábra Különböző szénforrások hatásának vizsgálata *fhl* operon transzkripciójára abszolút kvantifikációs reverz transzkripció kapcsolt Real-Time PCR módszerrel. A kísérlet során három kultúrából izolált RNS-en írtam cDNS-t, az *fhlH* gén 3' végére tervezett *fhl8frC1* primerrel. A Real-Time PCR során a hidrogenáz nagy alegységet kódoló génre tervezett primer párt használtam (*fhl05*-*fhl10*).

Mivel jól ismert tény, hogy a nem kén-függő heterotróf hipertermofil mikroorganizmusok növekedését kén jelenléte serkenti és ennek egyik lehetséges magyarázata a fölös redukáló erő H_2S formájában történő eltávolítása, a kén *fhl* operon transzkripciójára gyakorolt hatását is megvizsgáltam. Korábban leírták, hogy kén jelenlétében a hidrogenázok aktivitása csökken, hiszen a fölös redukáló erő jó része így H_2S formájában tud távozni (Adams és mts., 2001).

Általánosan elmondható, hogy a kén tartalmú mintáknál kis mértékben, de jobb növekedést figyeltem meg, mint a kénmentes mintáknál, ami megfelel az irodalomban leírtaknak (Schicho és mts., 1993). DM tápoldaton növesztett sejtekben a kén jelenlétének nincs hatása *fhl* operon transzkripciójára, viszont CM és DP tápoldat esetén jelentős transzkripciós aktivitásbeli csökkenés figyelhető meg (4.11. ábra).

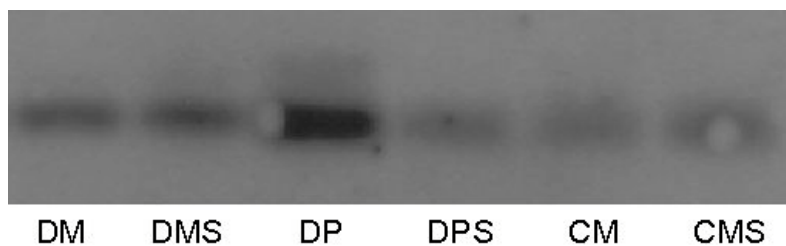


táp	pg
DM	1,01 ± 0,35
DMS	0,88 ± 0,16
DP	29,68 ± 3,25
DPS	9,47 ± 1,14
CM	17,12 ± 6,65
CMS	4,2 ± 1,95



4.11. ábra Kén hatása *fhl* operon transzkripciójára különböző szénforrást tartalmazó tápoldatokon. A kísérlet során három kultúrából izolált RNS-en írtam cDNS-t, az *fhlC* gén 3' végére tervezett fhl805 primerrel. A Real-Time PCR során használt primer pár: fhl805-fhl806 volt.

Mivel rendelkezésre állt az FhlB alegység ellen készített ellenanyag (ld. Anyagok és Módszerek), fehérje szinten is vizsgálni tudtam az operon kifejeződését (4.12. ábra). A Western hibridizációs kísérletek megmutatták, hogy fehérje szinten nincs olyan nagymértékű különbség az egyes növesztési körülmények között, de itt is kifejezett az FhlB expresszió magasabb szintje a DP tápoldatban a többi vizsgálati körülményhez képest, és ebben az esetben jelentős expresszió csökkenés figyelhető meg kén jelenlétében.



4.12. ábra Western hibridizáció anti-FhlB ellenanyaggal különböző tápoldatokon nevelt sejtekből nyert *T. litoralis* összfehérje mintán. A fehérjéket 12%-os denaturáló gélen választottam el.

Eredeti célunk az volt, hogy a komplex több fehérjéje ellen is poliklonális ellenanyagot állítsunk elő, de végül – technikai okokból – csak az FhlB alegység ellen készült el használható ellenanyag, ezért ezeket a kísérleteket a komplex más alegységével nem tudtam elvégezni.

Összefoglalva az eredményeket, a transzkripciós vizsgálatok alapján elmondható, hogy *T. litoralis*-ban az *fhl* operon termékei elsősorban a peptid metabolizmussal állnak kapcsolatban, hiszen DM tápoldaton nagyon alacsony, míg DP tápoldaton jelentősen megnövekedett *fhl* expressziót detektáltunk. Emellett a kénnek negatív hatása van a gének kifejeződésére mind CM mind DP tartalmú tápoldaton. A jelenség úgy értelmezhető, hogy a peptiden növesztett sejtekben keletkező felesleges redukáló erő egy részét a sejt az Fhl komplexen keresztül távolítja el, kén jelenlétében azonban az elektronok más útvonalon is távozhatnak, így az Fhl komplex szerepe visszaszorul és expressziója csökken.

4.2.5. A komplex sejtbeli lokalizációjának vizsgálata

Feltételezésünk szerint az általunk vizsgált Fhl géntermékek egy membránkomplexet alkotnak. Ezt arra alapozzuk, hogy a nyolcból három fehérje (FhlC,D,E) transzmembrán hélixeket tartalmaz és a hidrogenáz nagy és kis alegységek is inkább membránkötött hidrogenázokkal mutatnak hasonlóságot, mint szolubilis megfelelőikkel. Mivel a FhlB fehérje aminosav szekvenciája alapján hidrofíl karakterű, szolubilis fehérjének tűnik, úgy gondoltuk, ha a membrán frakcióban kapunk az ellene készített ellenanyaggal jelet, az arra utal, hogy a többi öt fehérje, és köztük FhlB is kapcsolódik a membránban elhelyezkedő alegységekhez.



4.13. ábra *T. litoralis* frakciókon végzett Western hibridizáció anti-FhlB ellenanyaggal.

SZ1: szolubilis frakció; SZ2: első mosás felülúszója; SZ3: második mosás felülúszója; MM: kétszer mosott membrán frakció. A fehérjéket 12%-os denaturáló gélen választottam el.

Az FhlB fehérje nagy része a szolubilis frakcióban található, a második mosás felülúszójában már nem detektálható, viszont kimutatható a kétszer mosott membránban. Valószínűleg a komplex instabil, a szolubilis alegységek könnyen leválnak a membránról. Ez

az irodalomból is jól ismert jelenség, a 4-es csoport modell enzime az *E. coli* 3-as hidrogenáz eleddig egyetlen tisztított alegységét, a nagy alegységet is a szolubilis frakcióból izolálták, és ismeretes, hogy a csoportba tartozó hidrogenázok, igen instabil, nehezen tisztítható enzimek (Kunkel és mts., 1998) A kapott eredmények tehát arra utalnak, hogy FhlB a membránhoz lazán asszociált fehérje (4.13. ábra), és nagy valószínűséggel a többi hidrophil alegység is hasonlóan viselkedik.

4.2.6. Enzim aktivitás mérés *T. litoralis* membrán és szolubilis frakciókkal

4.2.6.1. Hidrogenáz aktivitás mérés

A szakirodalomból már ismert, hogy a *T. litoralis* tartalmaz két szolubilis hidrogenázt, az ezeket kódoló géneket izolálták, és a hidrogenáz-1 fehérjét tisztították is (Rákhely és mts., 1999; Tóth és mts., 2002). A membrán kötött hidrogenázok meglétét csak a rokon fajokból származó adatokra támaszkodva feltételezhetjük. Annak kiderítésére, hogy van-e hidrogenáz aktivitás *T. litoralis* membrán frakcióban, méréseket végeztem hidrogén felvevő és hidrogén fejlesztő irányban. Hidrogén felvevő irányban benzil-viologénnel illetve metil-viologénnel is kaptam hidrogenáz aktivitást. A hidrogén fejlesztő irányban szintén sikerült kimutatni hidrogenáz jelenlétét a membrán frakcióban. A membrán tisztaságát glutamát-dehidrogenáz aktivitás méréssel ellenőriztem, mely a citoplazmában és csak a citoplazmában igen nagy mennyiségben jelen lévő fehérje (Ma és mts., 1994b; Sapra és mts., 2000). A szolubilis frakció glutamát-dehidrogenáz aktivitását 100%-nak véve a nem mosott membránban 50%-ra, egyszer mosott membránban 5%-ra, kétszer mosott membránban 2%-ra esik vissza az aktivitás.

4.2.6.2. Formát-dehidrogenáz aktivitás mérés

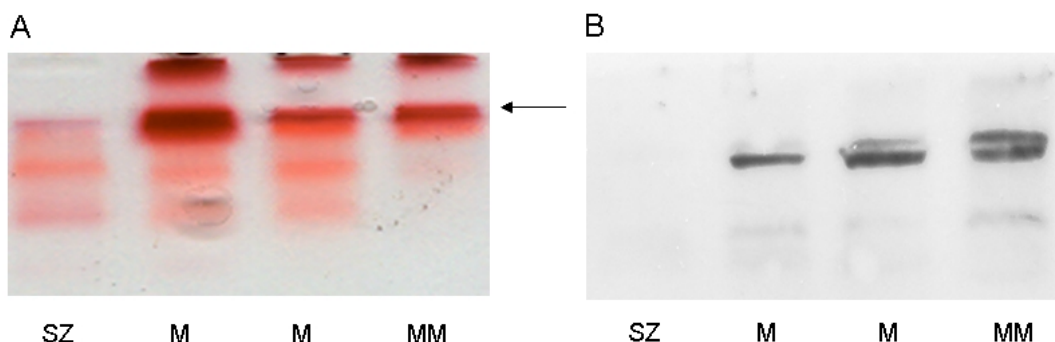
Több módon, különböző redox festékeket felhasználva próbáltam mérni formát-dehidrogenáz aktivitást, de sajnos a siker elmaradt. Ennek oka lehet a formát-dehidrogenázok az irodalomban leírt rendkívül nagy érzékenysége oxigénnel szemben.

Formát-hajtott hidrogén fejlesztő aktivitás néhány kísérletben kimutatható volt a *T. litoralis* sejtekből készített membrán frakciókban, azonban ez az eredmény nem volt reprodukálható.

4.2.7. Hidrogenáz aktivitás detektálás natív poliakrilamid gélben

A hidrogén fejlesztő illetve hidrogén felvevő mérésekkel csak a membránfrakció összhidrogenáz aktivitását tudom detektálni. Arra voltam kíváncsi, hogy össze tudom-e kapcsolni az anti-FhlB ellenanyag által adott jelet hidrogenáz aktivitással. Ennek kiderítésére hidrogén felvevő aktivitásra festettem *T. litoralis* natív poliakrilamid gélben elválasztott sejtfrakcióit, majd a megfestett gélen Western hibridizációt végeztem. A kísérlet eredménye azt mutatja, hogy a gélben azonos pozícióban detektálható FhlB fehérje és hidrogenáz aktivitás (4.14. ábra). A nem mosott membrán frakcióban (M) megjelenik a szolubilis frakcióra jellemző aktivitásmintázat is. A mintafelviteli zsebek alján lévő aktivitásfestődést a gélbe be nem futott fehérjék okozhatják.

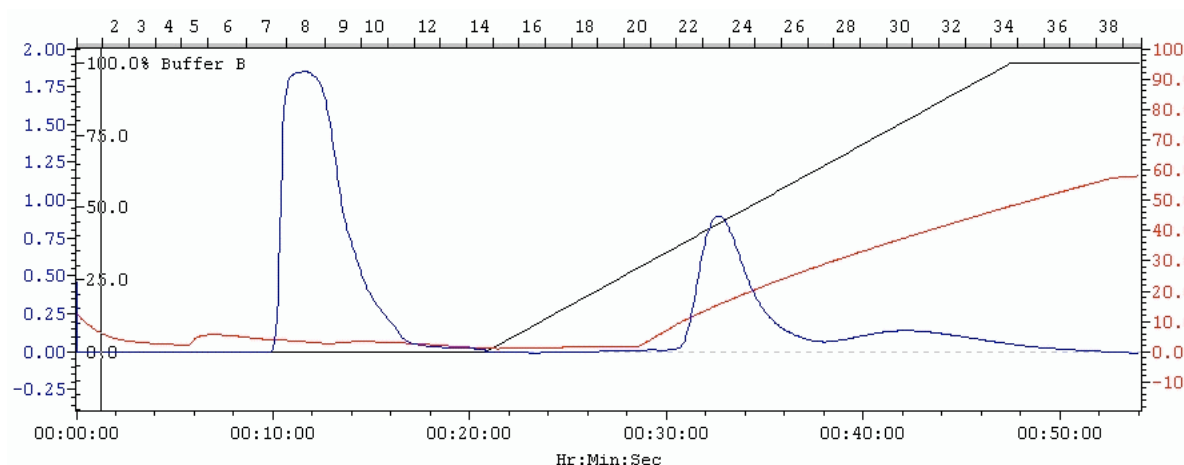
Az FhlB fehérje véletlenül is futhatna ugyanabba a pozícióba, ahol a hidrogenáz aktivitás is detektálható, azonban annak ellenére, hogy az FhlB fehérje nagy része az előzetes eredmények alapján a szolubilis frakcióban található (4.16. ábra), a natív gélben nem kaptam jelet ezzel a mintával. Ezért nem valószínű, hogy az FhlB alegység véletlenszerűen futott volna együtt a hidrogenázzal, hisz akkor a szolubilis mintában is azonos pozícióban meg kellene jelennie.



4.14. ábra Hidrogenáz aktivitás festés (A) és Western hibridizáció (B) natív poliakrilamid gélben elválasztott fehérjéken. **A** SZ: szolubilis frakció, M: nem mosott membrán frakció, MM: mosott membrán frakció. **B** A megfestett gélből a fehérjéket nitrocellulóz membránra vittem át, majd anti-FhlB ellenanyaggal Western hibridizációt végeztem. Az FhlB jelnek megfelelő hidrogenáz aktivitás sávot nyíllal jelöltem.

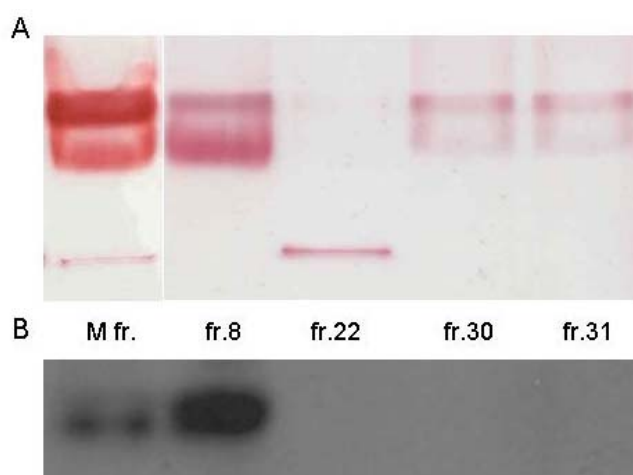
4.2.8. A komplex tisztítása

A membrán frakciót első lépésben kerámia hidroxipatit oszlopon tisztítottam. A kapott kromatogram a 4.15. ábrán látható. A gyűjtött frakciókon hidrogén fejlesztő aktivitás mérést végeztem. A 8-10, 22-25 és 28-35 frakciókban detektáltam hidrogenáz aktivitást.



4.15. ábra A *T. litoralis* membrán frakció tisztításának kromatogramja CHT oszlopon.

A legnagyobb hidrogén fejlesztő enzimaktivitást mutató frakciókat megfuttattam denaturáló poliakrilamid gélen, és Western hibridizációt végeztem. A mintákat Colourless Native poliakrilamid gélen is megfuttattam, mert ez sokkal jobb elválasztást tesz lehetővé membrán fehérjékre, mint a hagyományos natív-PAGE és megfestettem hidrogén felvevő aktivitásra. A kapott eredmények azt mutatják, hogy a 8-as frakcióhoz FhlB jelet és hidrogenáz aktivitást is lehet társítani (4.16. ábra). A 8-as, 30-as és 31-es frakciók aktivitás mintázata azonos, a tisztítani kívánt hidrogenáz egy kis része valószínűleg felkötődik az oszlopra, de ez a mennyiség Western hibridizációnál már nem mutatható ki. A gélben tulajdonképpen két hidrogenáz aktivitásra festődő sáv van, ezt vagy az Fhl komplex két különböző alakja vagy egy másik membrán kötött hidrogenáz jelenléte okozhatja.



4.16. ábra 5–13%-os CN-PAGE-sel elválasztott CHT hidrogenáz frakciók aktivitás festése (A), és a frakciók Western hibridizációja (B). A Western hibridizációhoz a fehérjét 12%-os denaturáló poliakrilamid gélen futtattam meg. M fr.: a CHT oszlopra vitt kiindulási membrán frakció.

A kromatogram közepén lemosódó hidrogenáz aktivitáshoz (22. frakció), nem társítható FhIB jel. Ez az aktivitás sáv lehet egy másik membrán kötött hidrogenáz vagy a két mosási lépés ellenére a membránfrakcióban maradt szolubilis hidrogenáz.

A CHT kromatográfia során tehát olyan tisztítási frakció nyerhető mely hidrogenáz aktivitással bír és kimutatható benne az FhIB fehérje. Sajnos formát-dehidrogenáz aktivitás ebben a frakcióban sem detektálható. A komplex tisztítása további kromatográfiai lépésekkel folyamatban van.

4.3. Eredmények tárgyalása

Munkám során izoláltam egy a hidrogenázok érésében szerepet játszó fehérjét kódoló operont (*hypCD*). E gének megléte és az időközben elkészült genom szekvenálásokból nyert adatok alapján a hipertermofil archaebaktériumokban a mezofil mikroorganizmusokéhoz hasonló vagy azzal azonos hidrogenáz érési folyamatokat meglétét feltételezhetjük.

Megvizsgáltam, hogy a *T. litoralis* HypC és HypD fehérjéje képes-e funkcionálisan helyettesíteni a mezofil *E. coli* és *R. eutropha* megfelelő fehérjéit. Siker esetén ez megkönnyíthetné hipertermofil mikroorganizmusokból nyert fehérjék heterológ gazdában történő előállítását. A *T. litoralis* HypC egyáltalán nem tudta komplementálni a mezofil sejtek *hypC* funkcióvesztéses mutációit és a HypD fehérje esetén is csak igen gyenge komplementációt tudtam kimutatni és az is csak a *R. eutropha* szolubilis enzim érési folyamatában működött.

A gyenge komplementáció egyrészt annak tudható be, hogy a vizsgált élőlények hőmérsékleti optimuma jelentősen eltér, másrészt az is lehetséges, hogy a komplementáció során nem sikerült optimális mennyiségű aktív kisegítő fehérjét termelni. Az érési folyamat pedig érzékeny arra, hogy a kisegítő fehérjék megfelelő arányban, koncentrációban legyenek jelen.

Az irodalomban egyetlen publikáció jelent meg, amely a kisegítő fehérjék heterológ komplementációs képességét vizsgálta (Fodor és mts., 2001). A kísérletek alapján azt a következtetést lehetett levonni, hogy bizonyos törzsek érési folyamatai annyira hasonlóak, hogy a kisegítő fehérjék kicserélhetőek (pl. *T. roseopercina* – *R. capsulatus*, *R. eutropha*), míg más esetekben (pl. *T. roseopercina* - *E. coli*) ez egyáltalán nem lehetséges. Minél közelebbi az evolúciós rokonság két faj illetve azok hidrogenázai között, annál nagyobb az esélye, hogy a heterológ komplementáció működik. Félig-meddig a mi eredményeink is ezt támasztják alá, hisz a HypD-vel kapott komplementáció csak a *R. eutropha* szolubilis hidrogenázán keresztül volt detektálható és ez az enzim a *T. litoralis* szolubilis hidrogenázával viszonylag szoros rokonságban van.

Izoláltam egy nyolc génből álló operont (*fhlABCDEFGH*), amely *in silico* analízis alapján egy 4-es típusú, H₂ fejlesztő, membrán kötött hidrogenázt és egy formát-dehidrogenázt kódol. Megvizsgálva négy, ismert genommal rendelkező közeli rokon fajt, hasonló operon megléte csak *Pyrococcus abyssi*-ben mutatható ki. Ez azért is érdekes, mert a többi membrán kötött hidrogenáz széles körben elterjedt a *Thermococcaceae* családban (4.2. táblázat).

	Hyh1	Hyh2	Mbh	Mbx	Fhl
<i>T. litoralis</i> DSM5473	+	+	+ ^b	n.a.	+ ^a
<i>P. abyssi</i> GE5	+	+	+	+	+
<i>P. horikoshii</i> OT3	+	-	+	+	-
<i>P. furiosus</i> DSM3638	+	+	+	+	-
<i>T. kodakaraensis</i> KOD1	+	-	+	+	-

4.2. táblázat Hidrogenázok előfordulása a *Thermococcaceae* család néhány tagjában

a: jelen dolgozat

b: *mbhA* gén megléte igazolt (Tóth András szóbeli közlés)

n.a.: nincs adat

Eredményeink szerint az operont alkotó gének egy transzkripció egységet alkotnak és az általuk kódolt fehérjék funkcionálisan is kapcsolnak. A formát-dehidrogenázok és a hidrogenázok együttműködésére, az ún. formát hidrogenáliázokra számos példa ismert.

E. coli-ban a komplex a szénhidrát metabolizmus során keletkező formát sejtből való eltávolításáért felelős és megvédi a citoplazmát a túlzott pH csökkenéstől. A formát piruvátból keletkezik, piruvát formátliáz (Pfl) enzim közreműködésével. Megvizsgálva a négy ismert *Thermococcaceae* genomot, csak a *T. kodakaraensis*-ben található piruvát formátliázt (ref:YP 182702) és piruvát formátliáz-aktivátor enzimet (ref:YP 182703) kódoló gén. Érdekes módon, ebben a mikroorganizmusban nem található a *T. litoralis*-éhoz hasonló *fhl* operon, igaz megtalálható benne a formát-dehidrogenáz két alegysége, melyek aminosav szekvencia szinten sorrendben 43 és 55%-os azonosságot mutatnak FhlA és FhlB fehérjékkel (ref:YP 184489 és ref:YP 184490), a hidrogenáz géneknek (FhlC-H) azonban nincsenek megfelelői. A *T. litoralis*-ban található egy piruvát formátliáz-aktivátor enzimmel homológ fehérjét kódoló gén (emb:CAA58794), de ez a gén *P. furiosus* (gb:AAL81173), *P. horikoshii* (ref:NP 143017) és *P. abyssi* (emb:CAB50031) genomban is megtalálható, miközben maga *pfl* nem, tehát megléte nem bizonyítéka *pfl* meglétének, emellett nem is hasonlítanak a *T. kodakaraensis*-ben található piruvát formátliáz-aktivátor enzimet kódoló génre.

A génexpresszió szintjének vizsgálatából kapott eredményeink is ez ellen az útvonal ellen szólnak, hiszen ha *T. litoralis*-ban is a szénhidrát metabolizmus lenne a formát fő forrása, DM tápoldaton kellett volna magas transzkripció aktivitást detektálni. Azonban eredményeink szerint a komplexet kódoló operon mRNS szintje peptid tartalmú tápoldaton növesztett sejtekben magas, tehát szubsztrátja a peptid lebontás során keletkezik. Sajnos az

aminosavak lebontási útvonala kevésbé felderített hipertermofil archaeobaktériumokban. Az aminosavak transzaminációjával létrejövő 2-ketosavak egy alternatív útvonalon aldehidekké dekarboxilálódhatnak, amelyek karboxil-savakká oxidálódnak (Adams és mts., 2001). Két aldehyd oxidáló enzimet is izoláltak mind *T. litoralis*-ból, mind *P. furiosus*-ból, ezek az aldehyd:ferredoxin oxidoreduktáz (AOR) (Mukund és Adams, 1991, 1993), és a formaldehyd:ferredoxin oxidoreduktáz (FOR) (Mukund és Adams., 1993; Roy és mts., 1999). Ezek közül FOR kizárólag C1-C3 aldehidek oxidációját végzi *in vitro*, fiziológias funkciója nem tisztázott, de az aminosav metabolizmusban tulajdonítanak neki szerepet (Mukund és Adams., 1993; Adams és mts., 2001). Mind AOR, mind FOR aktivitása során keletkezhet formaldehydből formát, ami az általunk vizsgált komplex szubsztrátja lehet, az egyelőre nem ismert, hogy milyen metabolikus útvonalon jöhet létre formaldehyd.

A négy ismert genommal rendelkező hipertermofil rokon közül csak *P. furiosus* metabolizmusát vizsgálták részletesen. Ezekben a kísérletekben azt találták, hogy a törzs nem vagy csak alig mutat növekedést peptid tartalmú táptalajon, megfelelő növekedés csak kén jelenlétében érhető el, amiről tudjuk, hogy a fölös redukálóerő eltávolításban játszik fontos szerepet. Elképzelhető, hogy *fhl* operon egy olyan alternatív metabolikus útvonal része, amely megléte lehetővé teszi *T. litoralis* számára, hogy kénmentes körülmények között is képes legyen peptid fermentációra.

5. Hivatkozások jegyzéke

- Adams, M.W.W. (1990) The structure and mechanism of iron-hydrogenases. *Biochim. Biophys. Acta* 1020: 115-145
- Adams, M.W.W., Stiefel, E.I. (2000) Organometallic iron: the key to biological hydrogen metabolism. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4: 214-220
- Adams, M.W.W., Holden, J.F., Menon, A.L., Schut, G.J., Grunden, A.M., Hou, C., Hutchins, A.M., Jenney, F.E., Kim, C., Ma, K., Pan, G., Roy, R., Sapra, R., Story, S.V., Verhagen, M.F.J.M. (2001) Key role for sulfur in peptide metabolism and in regulation of three hydrogenases in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *J. Bacteriol.* 183: 716-724
- Adams, M.W.W., Kletzin, A. (1996) Oxidoreductase-type enzymes and redox proteins involved in fermentative metabolism of hyperthermophilic archaea. *Adv. Prot. Chem.* 48: 101-180
- Afting, C., Hochheimer, A., Thauer, R.K. (1998) Function of H₂-forming methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase from *Methanobacterium thermoautotrophicum* in coenzyme F420 reduction with H₂. *Arch. Microbiol.* 169: 206-210
- Albracht, S.P.J. (1994) Nickel hydrogenases: in search of the active site. *Biochim. Biophys Acta* 1188: 167-204
- Albracht, S.P.J. (2001) Spectroscopy – the functional puzzle. Hydrogen as a Fuel. Learning from Nature című könyvben. Szerk.: R. Cammack, M. Frey, R. Robson. (London and New York: Taylor and Francis) 110-158
- Altenbuchner, J., Schmid, K., Schmitt, R. (1983) Tn1721-encoded tetracyclin resistance: mapping of structural and regulatory genes mediating resistance. *J. Bacteriol.* 153: 116-123
- Andrews, S.C., Berks, B.C., McClay, J., Ambler, A., Quail, M.A., Golby, P., Guest, J.R. (1997) A 12-cistron *Escherichia coli* operon (*hyf*) encoding a putative proton-translocating formate hydrogenlyase system. *Microbiology.* 143: 3633-3647

Ausubel, F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A. (1996) Current Protocols in Molecular Biology. Wiley, New York, N.Y.

Bagramyan K., Mnatsakanyan N., Poladian A., Vassilian A., Trchounian A. (2002) The roles of hydrogenases 3 and 4, and the F_0F_1 -ATPase, in H_2 production by *Escherichia coli* at alkaline and acidic pH. FEBS Lett. 516: 172-178

Bálint, B., Bagi, Z., Tóth, A., Rákhely, G., Perei, K., Kovács K.L. (2005) Utilization of keratin-containing biowaste to produce biohydrogen. Appl. Microbiol. Biotechnol. 69: 404-410

Barns, S.M., Delwiche C.F., Palmer J.D., Pace N.R. (1996) Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93: 9188-9193

Blokesch, M., Magalon, A., Böck, A. (2001) Interplay between the specific chaperone-like proteins HybG and HypC in maturation of hydrogenases 1, 2, and 3 from *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 183: 2817-2822

Blokesch, M., Paschos, A., Theodoratou, E., Bauer, A., Hube, M., Huth, S., Böck, A. (2002) Metal insertion into NiFe-hydrogenases. Biochem. Soc. Trans. 30: 674-680

Blokesch, M., Böck, A. (2006) Properties of the [NiFe]-hydrogenase maturation protein HypD. FEBS Lett. 580: 4065-4068

Böhm, R., Sauter, M., Böck, A. (1990) Nucleotide sequence and expression of an operon in *Escherichia coli* coding for formate hydrogenlyase components. Mol. Microbiol. 4: 231-243

Brinkman A.B., Dahlke I., Tuininga J.E., Lammers T., Dumay V., de Heus E., Lebbink J.H., Thomm M., de Vos W.M., van der Oost J. (2000) An Lrp-like transcriptional regulator from the archaeon *Pyrococcus furiosus* is negatively autoregulated. J. Biol. Chem. 275(49): 38160-38169

Brown, J.W., Daniels, C.J., Reeve, J.N. (1989) Gene structure, organization, and expression in archaeobacteria. Crit. Rev. Microbiol. 16: 287-337

- Bryant, F.O., Adams, M.W.W. (1989) Characterization of Hydrogenases from the Hyperthermophilic Archaeobacterium, *Pyrococcus furiosus*. J. Biol. Chem. 264: 5070-5079
- Burgdorf, T., van der Linden, E., Bernhard, M., Yin, Q.Y., Back, J.W., Hartog, A.F., Muijsers, A.O., de Koster, C.G., Albracht, S.P., Friedrich, B. (2005) The soluble NAD⁺-Reducing [NiFe]-hydrogenase from *Ralstonia eutropha* H16 consists of six subunits and can be specifically activated by NADPH. J. Bacteriol. 187: 3122-3132
- Buurman, G., Shima, S., Thauer, R.K. (2000) The metal-free hydrogenase from methanogenic archaea: evidence for a bound cofactor. FEBS Lett. 485: 200-204
- Cammack, R., Frey, M., Robson, R. (2001) Hydrogen as a fuel. Learning from Nature. Taylor & Francis Inc., London and New York
- Casadaban M.J., Cohen S.N. (1979) Lactose genes fused to exogenous promoters in one step using a *Mu-lac* bacteriophage: in vivo probe for transcriptional control sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 4530-4533
- Casalot, L., Rousset, M. (2001) Maturation of the [NiFe] hydrogenase. Trends Microbiol. 9: 228-236
- Cohen, G.N., Barbe, V., Flament, D., Galperin, M., Heilig, R., Lecompte, O., Poch, O., Prieur, D., Querellou, J., Ripp, R., Thierry, J.-C., Van der Oost, J., Weissenbach, J., Zivanovic, Y., Forterre, P. (2003) An integrated analysis of the genome of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus abyssi*. Mol. Microbiol. 47:1495-1512
- Demirjian D.C., Moris-Varas F., Cassidy C.S. (2001) Enzymes from extremophiles. Curr Opin. Chem. Biol. 5(2): 144-151
- Dernedde J., Eitinger T., Patange N., Friedrich B. (1996) *hyp* gene products in *Alcaligenes eutrophus* are part of a hydrogenase-maturation system. Eur. J. Biochem. 235:351-358
- Ding, H., Clark, R.J. (2004) Characterization of iron binding in IscA, an ancient iron sulfur cluster assembly protein. Biochem. J. 379(Pt 2): 433-40
- Frazzon, J., Fick, J.R., Dean, D.R. (2002) Biosynthesis of iron-sulfur clusters is a complex and highly conserved process. Biochem. Soc. Trans. 30: 680-685

- Fodor, B., Rákhely, G., Kovács, Á.T., Kovács, K.L. (2001) Transposon mutagenesis in purple sulfur photosynthetic bacteria: identification of *hypF*, encoding a protein capable of processing [NiFe] hydrogenases in α , β , and γ subdivision of the Proteobacteria. *Appl. Env. Microbiol.* 67: 2476-2483
- Fox, J.D., Kerby, R.L., Roberts, G.P., Ludden, P.W. (1996) Characterization of the CO-induced, CO-tolerant hydrogenase from *Rhodospirillum rubrum* and the gene encoding the large subunit of the enzyme. *J. Bacteriol.* 178: 1515-1524
- Friedrich, T., Weiss, H. (1997) Modular evolution of the respiratory NADH-ubiquinone oxidoreductase and the origin of its modules. *J. Theor. Biol.* 187: 529-540
- Friedrich, T., Scheide, D. (2000) The respiratory complex I of bacteria, archaea and eukarya and its module common with membrane-bound multisubunit hydrogenases. *FEBS Lett.* 479: 1-5
- Fukui, T., Atomi, H., Kanai, T., Matsumi, R., Fujiwara, S., Imanaka, T., (2005) Complete genome sequence of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 and comparison with *Pyrococcus* genomes. *Genome Res.* 15: 352-363
- Garcin, E., Vernede, X., Hatchikian, E.C., Volbed, A., Frey, M., Fontecilla-Camps, J.C. (1999) The chrystal structure of a reduced [NiFeSe] hydrogenase provides an image of the activated catalytic center. *Structure Fold Des.* 7: 557-566
- Happe, T., Schütz, K., Böhme, H. (2000) Transcriptional and mutational analysis of the uptake hydrogenase of the filamentous cyanobacterium *Anabaena variabilis* ATCC 29413. *J. Bacteriol.* 182: 1624-1631
- Happe, T., Hemschemeier, A., Winkler, M., Kaminski, A. (2002) Hydrogenases in green algae: do they save the algae's life and solve our energy problems? *Trends Plant Sci.* 7: 246-250
- Hedderich, R. (2004) Energy-converting [NiFe] hydrogenases from archaea and extremophiles: ancestors of complex I. *J. Bioenerg. Biomemb.* 36: 65-75

Higuchi, Y., Yagi, T., Yasuoka, N. (1997) Unusual ligand structure in Ni-Fe active center and an additional Mg site in hydrogenase revealed by high resolution X-ray structure analysis. *Structure* 5: 1671-1680

Higuchi, Y., Ogata, H., Miki, K., Yasuoka, N., Yagi, T. (1999) Removal of the bridging ligand atom at the Ni-Fe active site of [NiFe] hydrogenase upon reduction with H₂, as revealed by X-ray structure analysis at 1.4 Å resolution. *Structure* 7: 549-556

Horner, D.S., Foster, P.G., Embley, T.M. (2000) Iron hydrogenases and the evolution of anaerobic eukaryotes. *Mol. Biol. Evol.* 17: 1695-1709

Horner, D.S., Heil, B., Happe, T., Embley, T.M. (2002) Iron hydrogenases - ancient enzymes in modern eukaryotes. *Trends Biochem. Sci.* 27: 148-153

Inoue, H., Nojima H., Okayama H. (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96(1):23-28

Jacobi, A., Rossmann, R., Bock, A. (1992) The *hyp* operon gene products are required for the maturation of catalytically active hydrogenase isoenzymes in *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.* 158: 444-451

Kawarabayashi Y., Sawada M., Horikawa H., Haikawa Y., Hino Y., Yamamoto S., Sekine M., Baba S., Kosugi H., Hosoyama A., Nagai Y., Sakai M., Ogura K., Otuka R., Nakazawa H., Takamiya M., Ohfuku Y., Funahashi T., Tanaka T., Kudoh Y., Yamazaki J., Kushida N., Oguchi A., Aoki K., Nakamura Y., Robb T.F., Horikoshi K., Masuchi Y., Shizuya H., Kikuchi H. (1998) Complete sequence and gene organization of the genome of a hyper-thermophilic archaeobacterium, *Pyrococcus horikoshii* OT3. *DNA Res.* 5: 55-76

Keen N.T., Tamaki, S., Kobayashi D., Trollinger, D. (1988) Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in Gram-negative bacteria. *Gene* 70:191-197

Kengen, S.W.M., Stams, A.J.M., de Vos, W.M. (1996) Sugar metabolism of hyperthermophiles. *FEMS Microbiol. Rev.* 18: 119-137

Kleihues, L., Lenz, O., Bernhard, M., Buhrke, T., Friedrich, B. (2000) The H₂ sensor of *Ralstonia eutropha* is a member of the subclass of regulatory [NiFe] hydrogenases. *J. Bacteriol.* 182: 2716-2724

Kletzin, A., Adams, M.W.W. (1996) Tungsten in biological systems. FEMS Microbiol. Rev. 18: 5-63

Künkel, A., Vorholt, J.A., Thauer, R.K., Hedderich, R. (1998) An *Escherichia coli* hydrogenase-3-type hydrogenase in methanogenic archaea. Eur. J. Biochem. 252: 467-476

Londei, P. (2007) Translational mechanism and protein synthesis. Archaea: Evolution, Physiology and Molecular Biology című könyvben. Szerk.: Garrett, R. és Klenk, H. (Blackwell Publishing) 217-228

Lyon, E.J., Shima, S., Buurman, G., Chowdhuri, S., Batschauer, A., Steinbach, K., Thauer, R.K. (2004) UV-A/blue-light inactivation of the 'metal-free' hydrogenase (Hmd) from methanogenic archaea. Eur. J. Biochem. 271: 195-204

Ma K., Schicho R.N., Kelly R.M., Adams M.W.W. (1993) Hydrogenase of the hyperthermophile *Pyrococcus furiosus* is an elemental sulfur reductase or sulfhydrogenase: evidence for a sulfur-reducing hydrogenase ancestor. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 90(11): 5341-5344

Ma, K., Adams, M.W.W. (1994) Sulfide dehydrogenase from the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus* : a New Multifunctional Enzyme Involved in the Reduction of Elemental Sulfur. J. Bacteriol. 176: 6509-6517

Ma, K., Zhou, Z.H., Adams, M.W.W. (1994a) Hydrogen production from pyruvate by enzymes purified from the hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus furiosus*: A key role for NADPH. FEMS Microbiol. Lett. 122: 245-250

Ma, K., Robb, F.T., Adams, M.W.W. (1994b) Purification and Characterization of NADP-Specific Alcohol Dehydrogenase and Glutamate Dehydrogenase from the Hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus litoralis*. Appl. Env. Microbiol. 60: 562-568

Ma, K., Weiss, R., Adams, M.W.W. (2000) Characterization of hydrogenase II from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* and assessment of its role in sulfur reduction. J. Bacteriol. 182: 1864-1871

Maeder, D.L., Weiss, R.B., Dunn, D.M., Cherry, J.L., Gonzalez, J.M., DiRuggiero, J., Robb, F.T. (1999) Divergence of the hyperthermophilic archaea *Pyrococcus furiosus* and *P. horikoshii* inferred from complete genomic sequences. Genetics 152:1299-305

Magalon, A., Böck, A. (2000a) Dissection of the maturation reactions of the [NiFe] hydrogenase 3 from *Escherichia coli* taking place after nickel incorporation. FEBS Lett. 473: 254-258

Magalon, A., Böck, A. (2000b) Analysis of the HypC-HycE complex, a key intermediate in the assembly of the metal center of the *Escherichia coli* hydrogenase 3. J. Biol. Chem. 275: 21114-21120

Mai, X., Adams, M.W.W. (1996) Characterization of a forth type of 2-keto acid-oxidizing enzyme from a hyperthermophilic archaeon : 2-ketoglutarate ferredoxin oxidoreductase from *Thermococcus litoralis*. J. Bacteriol. 178:5890-5896

Maier, T., Lottspeich, F., Böck, A. (1995) GTP hydrolysis by HypB is essential for nickel insertion into hydrogenases of *Escherichia coli*. Eur. J. Biochem. 230: 133-138

Maier, T., Binder, U., Böck, A. (1996) Analysis of the *hydA* locus of *Escherichia coli*: two genes (*hydN* and *hypF*) involved in formate and hydrogen metabolism. Arch. Microbiol. 165: 333-341

Maróti G., Fodor B.D., Rákhely G., Kovács Á.T., Arvani S., Kovács K.L. (2003) Selectivity and cooperativity of accessory proteins in the biosynthesis of [NiFe] hydrogenases. Eur. J. Biochem. 270:2218-2227

Meuer, J., Bartoschek, S., Koch, J., Künkel, A., Hedderich, R. (1999) Purification and catalytic properties of Ech hydrogenase from *Methanosarcina barkeri*. Eur. J. Biochem. 265: 325-335

Montet, Y., Amara, P., Volbeda, A., Vernede, X., Hatchikian, E.C., Field, M.J., Frey, M., Fontecilla-Camps, J.C. (1997) Gas access to the active site of Ni-Fe hydrogenases probed by X-ray crystallography and molecular dynamics. Nat. Struct. Biol. 4: 523-526

Mukund, S., Adams, M.W.W. (1991) The novel tungsten-iron-sulfur protein of the hyperthermophilic archaebacterium *Pyrococcus furiosus*, is an aldehyde ferredoxin oxidoreductase. J. Biol. Chem. 266:14208-14216

Mukund, S., Adams, M.W.W. (1993) Characterization of a novel tungsten-containing formaldehyde ferredoxin oxidoreductase from the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus*

litoralis. J. Biol. Chem. 268: 13592-13600

Neuner, A., Jannasch, H.W., Belkin, S., Stetter, K.O. (1990) *Thermococcus litoralis* sp. nov.: A new species of extremely thermophilic marine archaeobacteria. Arch. Microbiol. 153: 205-207

Nicolet, Y., Piras, C., Legrand, P., Hatchikian, C.E., Fontecilla-Camps, J.C. (1999) *Desulfovibrio desulfuricans* iron hydrogenase: the structure shows unusual coordination to an active site Fe binuclear center. Structure Fold Des. 7: 13-23

Olson, J.W., Fu, C., Maier, R.J. (1997) The HypB protein from *Bradyrhizobium japonicum* can store nickel and is required for the nickel-dependent transcriptional regulation of hydrogenase. Mol. Microbiol. 24: 119-128

Olson, J.W., Mehta, N.S., Maier, R.J. (2001) Requirement of nickel metabolism proteins HypA and HypB for full activity of both, hydrogenase and urease in *Helicobacter pylori*. Mol. Microbiol. 39: 176-182

Oxelfelt, F., Tamagnini, P., Lindblad, P. (1998) Hydrogen uptake in *Nostoc* sp. strain PCC 73102. Cloning and characterization of a *hupSL* homolog. Arch. Microbiol. 169: 267-274

Parales R.E., Harwood, C.S. (1993) Construction and use of a new broad-range *lacZ* transcriptional fusion vector, pHRP309, for Gram- bacteria. Gene 133: 23-30

Paschos, A., Glass, R. S., Böck, A. (2001) Carbamoylphosphate requirement for synthesis of the active center of [NiFe]-hydrogenases. FEBS Lett. 488: 9-12

Paschos, A., Bauer, A., Zimmermann, A., Zehelein, E., Böck, A. (2002) HypF, a carbamoyl phosphate converting enzyme involved in [NiFe]-hydrogenase maturation. J. Biol. Chem. 277: 49945-49951

Pedroni, P., Della Volpe, A., Galli, G., Mura, G.M., Prates C., Grandi, G. (1995) Characterization of the locus encoding the [Ni-Fe] sulfhydrogenase from the archaeon *Pyrococcus furiosus*: evidence for a relationship to bacterial sulfite reductases. Microbiology. 141: 449-458

Peters, J.W., Lanzilotta, W.N., Lemon, B.J., Seefeldt, L.C. (1998) X-ray crystal structure of the Fe-only hydrogenase (Cpl) from *Clostridium pasteurianum* to 1.8 Ångström resolution.

Pohorelic, B.K., Voordouw, J.K., Lojou, E., Dolla, A., Harder, J., Voordouw, G. (2002) Effects of deletion of genes encoding Fe-only hydrogenase of *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough on hydrogen and lactate metabolism. J. Bacteriol. 184: 679-86

Posewitz, M.C., King, P.W., Smolinski, S.L., Zhang, L., Seibert, M., Ghirardi M.L. (2004) Discovery of two novel radical S-adenosylmethionine protein required for the assembly of an active [Fe] hydrogenase. J. Biol. Chem. 279: 25711-25720

Rákhely, G., Zhou, Z.H., Adams, M.W.W., Kovács, K.L. (1999) Biochemical and molecular characterization of the [NiFe] hydrogenase from the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus litoralis*. Eur. J. Biochem. 266: 1158-1165

Rákhely, G., Kovács, Á.T., Maróti, G., Fodor, B.D., Csanádi, G., Latinovics, D., Kovács, K.L. (2004) Cyanobacterial-type, heteropentameric, NAD⁺-reducing NiFe hydrogenase in the purple sulfur photosynthetic bacterium *Thiocapsa roseopersicina*. Appl. Environ. Microbiol. 70: 722-728

Reissmann, S., Hochleitner, E., Wang, H., Paschos, A., Lottspeich, F., Glass, R.S., Böck, A. (2003) Taming of a poison: biosynthesis of the NiFe-hydrogenase cyanide ligands. Science. 299: 1067-1070

Rinker, K.D., Kelly, R.M. (1996) Growth physiology of the hyperthermophilic *Thermococcus litoralis*: development of a sulfur-free defined medium, characterization of an exopolysaccharide, and evidence of biofilm formation. Appl. Env. Microbiol. 62: 4478-4485

Roseboom, W., Blokesch, M., Böck, A., Albracht, S.P.J. (2005) The biosynthetic routes for carbon monoxide and cyanide in the Ni-Fe active site of hydrogenases are different. FEBS Lett. 579:469-472

Rossi, M., Pollock, W.B., Reij, M., Keon, R.G., Fu, R., Voordouw, G. (1993). The *hmc* operon of *Desulfovibrio vulgaris* subsp. *vulgaris* Hildenborough encodes a potential transmembrane redox protein complex. J. Bacteriol. 175: 4699-4711.

Roy, R., Mukund, S., Schut, G.J., Dunn, D.M., Weiss, R., Adams, M.W.W. (1999) Purification and molecular characterization of the tungsten-containing formaldehyde

ferredoxin oxidoreductase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*: the third of a putative five-member tungstoenzyme family. J. Bacteriol. 181: 1171-1180

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989) Molecular Cloning: a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York

Sapra, R., Verhagen, M.F., Adams, M.W. (2000) Purification and characterization of a membrane-bound hydrogenase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. J. Bacteriol. 182: 3423-3428

Sapra, R., Bagramyan, K., Adams, M.W. (2003) A simple energy-conserving system: proton reduction coupled to proton translocation. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 100: 7545-7550

Sargent, F., Berks, B.C., Palmer, T. (2002) Assembly of membrane-bound respiratory complexes by the Tat protein transport system. Arch. Microbiol. 178: 77-84

Sawers, R.G. (2005) Formate and its role in hydrogen production in *Escherichia coli*. Biochem. Soc. Trans. 33: 42-46

Sawers, G.R., Ballantine, S.P., Boxer, D.H., (1985) Differential expression of hydrogenase isoenzymes in *Escherichia coli* K-12: evidence for a third isoenzyme. 164: 1324-1331

Schagger, H., Cramer, W.A., Jagow, G. (1994) Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. Anal. Biochem. 217: 220-230

Schicho, R.N.K., Ma, K., Adams, M.W.W., Kelly, R.M. (1993) Bioenergetics of sulfur reduction in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. J. Bacteriol. 175: 1823-1830

Schink, B., Schlegel, H.G., (1979) The membrane-bound hydrogenase of *Alcaligenes eutrophus*. I. Solubilization, purification and biochemical properties. Biochim. Biophys. Acta 569: 315-324

Schneider, K., Schlegel, H.G. (1976) Purification and properties of soluble hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus* H16. Biochim. Biophys. Acta 452: 66-80

Schut, G.J., Zhou, J., Adams, M.W.W. (2001) DNA microarray analysis of the

hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*: evidence for a new type of sulfur-reducing enzyme complex. J. Bacteriol. 183: 7027-7036

Silva, P.J., van den Ban, E.C.D., Wassink, H., Haaker, H., de Castro, B., Robb, F.T., Hagen, W.R. (2000) Enzymes of hydrogen metabolism in *Pyrococcus furiosus*. Eur. J. Biochem. 267: 6541-6551

Soppa J. (1999) Transcription initiation in Archaea: facts, factors and future aspects. Mol. Microbiol. 31: 1295-1305

Tabor, S., Richardson, C.C. (1985) A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. Proc. Natl. Acad. Sci. 82: 1074-1078

Tamagnini, P., Axelsson, R., Lindberg, P., Oxelfelt, F., Wünschiers, R., Lindblad, P. (2002) Hydrogenases and hydrogen metabolism of Cyanobacteria. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 66: 1-20

Tersteegen, A., Hedderich, R. (1999) *Methanobacterium thermoautotrophicum* encodes two multisubunit membrane-bound [NiFe] hydrogenases. Transcription of the operons and sequence analysis of the deduced proteins. Eur. J. Biochem. 264: 930-943

Thauer, R.K., Klein, A.R., Hartmann, G.C. (1996) Reactions with molecular hydrogen in microorganisms: evidence for a purely organic hydrogenation catalyst. Chem. Rev. 96(7): 3031-3042

Theodoratou, E., Paschos, A., Magalon, A., Fritsche, E., Huber, R., Böck, A. (2000) Nickel serves as a substrate recognition motif for the endopeptidase involved in hydrogenase maturation. Eur. J. Biochem. 267: 1995-1999

Tóth, A., Rákhely, G., Kovács, K.L., (2002) Expression and activity of hydrogenases in *Thermococcus litoralis* grown under various conditions. poszter: Extremophiles 2002 The 4th International Congress on Extremophiles (2002) Szeptember 22-26, Nápoly, Olaszország

Tusnády, G.E., Simon, I. (2001) The HMMTOP transmembrane topology prediction server. Bioinformatics 17:849-850

Vignais, P.M., Dimon, B., Zorin, N.A., Tomiyama, M., Colbeau, A. (2000) Characterization of the hydrogen-deuterium exchange activities of the energy-transducing HupSL hydrogenase and

the H₂-signaling HupUV hydrogenase in *Rhodobacter capsulatus*. J. Bacteriol. 182: 5997-6004

Vignais, P.M., Billoud, B., Meyer, J. (2001) Classification and phylogeny of hydrogenases. FEMS Microbiol. Rev. 25: 455-501

Vignais, P.M., Colbeau, A. (2004) Molecular biology of microbial hydrogenases. Curr. Issues Mol. Biol. 6(2): 159-88

Vignais, P.M., Willison, J.C., Colbeau, A. (2004) H₂ respiration. Respiration in Archaea and Bacteria. Vol 2. Diversity of prokaryotic respiratory systems című könyvben. Szerk.: D. Zannoni. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands

Volbeda, A., Charon, M.H., Piras, C., Hatchikian, E.C., Frey, M., Fontecilla-Camps, J.C. (1995) Crystal structure of the nickel-iron hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*. Nature 373: 580-587

Volbeda, A., Garcin, E., Piras, C., de Lacey, A.L., Fernandez, V.M., Hatchikian, E.C., Frey, M., Fontecilla-Camps, J.C. (1996) Structure of the [NiFe] hydrogenase active site: Evidence for biologically uncommon Fe ligands. J. Am. Chem. Soc. 118: 12989-12996

Volbeda, A., Montet, Y., Vernède, X., Hatchikian, E. C., Fontecilla-Camps, J. C. (2002) High-resolution crystallographic analysis of *Desulfovibrio fructosovorans* [NiFe] hydrogenase. Intern. J. Hydrogen Energy 27: 1449-1461

Woese, C.R., Kandler, O., Wheelis, M.L. (1990) Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria* and *Eucarya*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 4576-4579

Yeang H.Y., Yusof F., Abdullah L. (1998) Protein purification for the Lowry assay: acid precipitation of proteins in the presence of sodium dodecyl sulfate and other biological detergents. Anal.Biochem. 265(2): 381-384

Zhang, J.W., Butlands, G., Greenblatt, J.F., Emili, A., Zamble, D.B., (2005) A Role for SlyD in the *Escherichia coli* Hydrogenase Biosynthetic Pathway. J.Biol.Chem. 280: 4360-4366

Zheng, L., White, R.H., Cash, V.L., Jack, R.F., Dean, D.R. (1993) Cysteine desulfurase activity indicates a role for NifS in metallocluster biosynthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.

Zheng, L., White, R.H., Cash, V.L., Dean, D.R. (1994) Mechanism for the desulfurization of L-cysteine catalyzed by the *nifS* gene product. *Biochemistry* 33: 4714-4720

Zheng, L., Cash, V.L., Flint, D.H., Dean, D.R. (1998) *iscSUA-hscBA-fdx* gene cluster from *Azotobacter vinelandii*. *J. Biol. Chem.* 273: 13264-13272

Zillig, W., Holz, I., Janekovic, D., Schafer, W., Reiter, W.D. (1983) The archaebacterium *Thermococcus celer* represents a novel genus within the thermophilic branch of the archaebacteria. *System. Appl. Microbiol.* 4: 88-94

Zillig, W., Holz, I., Klenk, H.-P., Trent, J., Wunderl, S., Janekovic, D., Imse, E., Haas, B. (1987) *Pyrococcus woesei*, sp. nov., an ultra-thermophilic marine archaebacterium, representing a novel order, Thermococcales. *System. Appl. Microbiol.* 9: 62-70

Zirngibl, C., Van Dongen, W., Schworer, B., Von Bunau, R., Richter, M., Klein, A., Thauer, R.K. (1992) H₂-forming methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase, a novel type of hydrogenase without iron-sulfur clusters in methanogenic archaea. *Eur. J. Biochem.* 208: 511-520

6. Saját közlemények jegyzéke

6.1. A dolgozat témájához kapcsolódó közlemények

Takács M., G. Rákhely, K.L. Kovács (2001) Molecular characterization and heterologous expression of hypCD, the first two [NiFe] hydrogenase accessory genes of *Thermococcus litoralis*. Arch Microbiol. 176(3): 231-235

M. Takács, G. Rákhely, K. L. Kovács Characterization of a putative respiratory complex in the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus litoralis*. Extremophiles 2002 The 4th International Congress on Extremophiles (2002) Szeptember 22-26, Nápoly, Olaszország

M. Takács, G. Rákhely, A. Tóth, K. L. Kovács Identification of *hypCD* genes encoding proteins involved in the maturation process of the NiFe hydrogenase in *Thermococcus litoralis*. 3rd International Congress on Extremophiles (2000) Szeptember 3-7, Hamburg-Harburg, Németország

M. Takács, G. Rákhely, K.L. Kovács Isolation of accessory genes, encoding proteins involved in the maturation process of the NiFe hydrogenase from *Thermococcus litoralis*. VIth International Conference on the Molecular Biology of Hydrogenases (2000) Augztus 5-10, Berlin, Németország

M. Takács, B. Fodor, G. Rákhely, K.L. Kovács Identification of genes coding for proteins playing role in the maturation processes of thermophilic NiFe hydrogenases Beyond the Genome, 18th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology (2000) Július 16-20, Birmingham, Egyesült Királyság

M. Takács, G. Rákhely, K.L. Kovács Hydrogenase related genes in *Thermococcus litoralis* Thermophiles '98 (1998) Szeptember 6-11, Brest, Franciaország

M. Takács, G. Rákhely, K.L. Kovács Hydrogene metabolism in a hyperthermophilic archaeon. Előadás: COST Action 841 Biological and Biochemical Diversity of Hydrogene Metabolism Workshop (2005) Május 1-3 Porto, Portugália

M. Takács, A. Tóth, G. Rákhely, K. L. Kovács Genes and proteins related to hydrogen metabolism in *Thermococcus litoralis*. Előadás az EU 5-ös keretprogram PYRED program találkozáson. (2002) Szeptember 22, Nápoly, Olaszország

6.2. További közlemények

K. L. Kovács, Cs. Bagyinka, L. Bodrossy, R. Csáki, B. Fodor, K. Győrfi, T. Hanczár, M. Kálmán, J. Ósz, K. Perei, B. Polyák, G. Rákhely, **M. Takács**, A. Tóth, J. Tusz (2000) Recent advances in biohydrogen research. Pflügers Archiv Eur. J. Physiol. 439: R81-R83

Kovács K.L., Z. Bagi, Cs. Bagyinka, L. Bodrossy, R. Csáki, B. Fodor, T. Hanczár, J. Tusz, M. Kálmán, J. Klem, Á. Kovács, Jian Lu, M. Magony, G. Maróti, K. Perei, B. Polyák, S. Arvani, **M. Takács**, A. Tóth, G. Rákhely (2000) Biohydrogen, Biogas, Bioremediation. Acta Biol. Debrecina. 22: 47-54

C. Dahl, G. Rákhely, A.S. Pott-Sperling, B. Fodor, **M. Takács**, A. Tóth, M. Kraeling, K. Győrfi, A. Kovács, J. Tusz, K. L. Kovács (1999) Genes involved in hydrogen and sulfur metabolism in phototrophic sulfur bacteria. FEMS Microbiology Letters 180: 317-324

K.L. Kovács, Cs. Bagyinka, H. Bratu, L. Bodrossy, B. Fodor, K. Győrfi, T. Hanczár, M. Kálmán, J. Ósz, B. Polyák, G. Rákhely, **M. Takács**, A. Tóth, J. Tusz (1998) Environmental research in the "Universitas Biotechnology Laboratory" Acta Biologica Szegediense 43: 111-116

Takács M., Rákhely G., Kovács L.K. Különc mikroorganizmusok (1998) Élet és Tudomány. LIII. /3: 79-81

Köszönetnyilvánítás

Köszönetet mondok az SzTE Biotechnológiai Tanszékének és az MTA Szegedi Biológiai Központ Biofizikai Intézetének azért, hogy munkámhoz a feltételeket készségesen biztosították.

Külön köszönet Prof. Kovács Kornélnak, hogy a Biotechnológiai Tanszéken végzett munkámat lehetővé tette.

Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Rákhely Gábornak a lehetőséget, hogy egyetemi és Ph.D. éveim alatt irányítása alatt dolgozhattam. Köszönöm értékes szakmai tanácsait, bátorítását és támogatását.

Köszönöm Deli Máriának az ELISA kísérletek során nyújtott felbecsülhetetlen segítségét, és Bogos Balázsnak, hogy lelkes munkájával nagyban hozzájárult a FhIB fehérje tisztításához.

Köszönetet mondok az MTA SZBK Tömegspektrometriai Laboratórium dolgozóinak.

Köszönet az állatház dolgozóinak az ellenanyag készítés során nyújtott segítségükért.

Hálás vagyok Tóth Andrásnak, Kovács Ákosnak és Fodor Barnának a tanulságos beszélgetésekért, munkámhoz nyújtott önzetlen segítségükért és kiváló ötleteikért.

Köszönetet mondok a Redox metalloprotein csoport valamennyi munkatársának, akik munkám sikeréhez nagyban hozzájárultak.

Külön köszönet családomnak és barátaimnak, akik tanulmányaim során mindvégig biztattak és támogattak, akikre mindig számíthattam.

Összefoglalás

Eredményeim a következő pontokban foglalhatók össze:

1. Izoláltam és meghatároztam a nukleotidsorrendjét a *T. litoralis* genom egy tíz kilobázis és egy négy kilobázis hosszú szakaszának.
2. Szekvencia analízist végeztem a fent említett DNS szakaszokon, ennek eredményeképpen kiderült, hogy a négy kilobázisos szakaszon a mezofil mikroorganizmusokban jól ismert HypC és HypD hidrogenáz érésben szerepet játszó fehérjéket kódoló gének azonosíthatók. Primer extenzióval meghatároztam a transzkripció starthelyét és ez alapján a gének előtt konzervált archaebakteriális promóter szekvenciákat azonosítottam. Bizonyítottam, hogy *hypCD* génekhez tartozó transzlációs szignálok - mint pl. a riboszóma kötőhelyek - alkalmasak bakteriális rendszerben való fehérjeexpresszióra.
3. A HypC és HypD fehérjéket heterológ gazdába *E. coli*-ba és *R. eutropha*-ba juttattam, ahol elvégeztem funkcionális analízisüket.
4. A szolubilis hidrogenáz-1 enzimet kódoló operontól 5' irányban lévő tíz kilobázis hosszú szakaszon egy nyolc génből álló operont azonosítottam, amely egy formát-dehidrogenázból, és egy hat alegységes membrán-kötött hidrogenázból álló komplex alegységeit kódolják. A gének előtt tipikus archaebakteriális promóter régió azonosítható, és mindegyiket jellegzetes riboszómális kötőhely előzi meg. Az egyes gének elrendeződéséből arra következtettünk, hogy egy transzkripció egységet alkotnak, ezt a feltevésünket RT-PCR kísérletekkel alá is támasztottam.
5. Reverz transzkripció kapcsolt Real-Time PCR segítségével vizsgáltam az operon transzkripció aktivitását, különböző szénforrásokat tartalmazó tápoldatokon növesztett sejteken, illetve vizsgáltam kén jelenlétének hatását. A kapott eredmények alapján kijelenthetjük, hogy az *fhl* operon terméke az aminosav anyagcseréhez kapcsolt, valószínűleg az itt keletkező fölös redukáló erő eltávolítása a feladata. Kén jelenlétében aktivitása csökken, ez azzal magyarázható, hogy ebben az esetben alternatív útvonal nyílik meg a sejt redox egyensúlyának fenntartására.

6. A komplex egy fehérjét (FhlB) *E. coli*-ban túltermeltettem His-tag fúziós fehérje formájában, és nikkel kelátoló oszlopon tisztítottam. A tisztított FhlB fehérjével egy pár nyulat immunizáltam, poliklonális ellenanyag termeltetés céljából. Az anti-FhlB ellenanyagot tisztítottam, és azzal Western hibridizációs kísérleteket végeztem.

7. A Western hibridizációs kísérletekben kimutattam, hogy a komplex a sejtmembránban helyezkedik el, bár FhlB és valószínűleg vele együtt a komplex többi hidrophil karakterű eleme gyengén asszociált a membránhoz.

8. Hidrogenáz aktivitást mutattam ki *T. litoralis* membrán frakcióból mind felvevő, mint hidrogén fejlesztő irányban. A hidrogenáz felvevő aktivitás natív poliakrilamid gélben is detektálható volt.

9. Western hibridizációs kísérletekben sikerült kimutatni az FhlB fehérje jelenlétét natív poliakrilamid gélben ugyanabban a pozícióban ahol a hidrogenáz aktivitást volt. Ez és a CHT kromatográfia során történő együtt tisztulás arra utal, hogy a membrán frakcióban jelen lévő hidrogenáz és a formát-dehidrogenáz egy komplexet alkot.

Summary

My results are summarized in the following points:

1. A ten kilobase and a four kilobase long region of *T. litoralis* genom were isolated and sequenced.
2. Genes coding for HypC and HypD accessory proteins were found in the four kilobase long fragment. After the determination of the transcriptional start site by primer extension a conserved archaeal promoter was identified. The compatibility of the translational signals of *hypCD* genes (ex. ribosomal binding sites) for protein expression in bacterial host was proven.
3. The HypC and HypD proteins were expressed in *E. coli* and *R. eutropha* in order to perform a functional analyses.
4. The sequence analysis shows that the ten kilobase long region upstream from *hyh-1* operon contains eight genes. Based on *in silico* analysis they code for a complex consisting of a formate-dehydrogenase, and a six-subunit membrane-bound hydrogenase. Every gene is preceded by typical ribosomal binding sites and a conserved archaeal promoter can be found. We showed in RT-PCR experiments that the *fhl* genes form one transcriptional unit.
5. The transcriptional activity of *fhl* operon was investigated in reverse transcription linked Real-Time PCR experiments, using cells grown on different carbon sources and the effect of the presence and absence of sulfur was also checked. Results suggested that the complex coded by the operon was linked to aminoacid metabolism. Its physiological role is to remove excess reducing equivalents from the cell. In the presence of sulfur the transcription of the operon was lower than in the absence of S⁰, in the former case H₂S production acts as an alternative pathway.
6. A protein (FhIB) of the complex was expressed in form of His-tag fusion protein in *E. coli* and purified on nickel chelating column. The purified FhIB was used in immunisation of rabbits, in order to produce polyclonal antibody. The anti-FhIB antibody was purified from rabbit serum and was used in Western hybridization experiments.

7. Western hybridization experiments suggested that the complex was located in the cell membrane, though FhlB and likely the other hydrophilic subunits are weakly associated to the membrane.

8. Hydrogenase activity was detected in the membrane fraction in both uptake and evolution direction. The uptake hydrogenase activity measurement was performed in native polyacrilamide gel as well.

9. FhlB protein was detected in native gel with anti-FhlB in Western hybridization experiments. Its migration position coincided with that of the hydrogenase activity. This and the co-purification of hydrogenase activity and FhlB on CHT chromatography shows that the hydrogenase and the formate-dehydrogenase forms one complex.