

Hidrogén és kén anyagcserében szerepet játszó  
NAD<sup>+</sup>/NADP<sup>+</sup> függő enzimek *Thermococcus litoralis*  
hipertermofil archaebaktériumban

Ph.D. Tézisek

*Készítette:*

Tóth András

*Témavezetők:*

Prof. Kovács L. Kornél

Dr. Rákhely Gábor

Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Központ

Biofizikai Intézet

Szegedi Tudományegyetem Biotechnológiai Tanszék

Szeged

2008

## Bevezetés

Az emberiség folyamatosan növekvő energiaszükségletének jelentős részét fosszilis energiahordozók felhasználásával fedezi, amelyek jelenleg ismert készletei csak néhány évtizedre elegendőek. Ezek elégetésével a fotoszintetizáló élőlények által évmilliók alatt megkötött szén-dioxidot néhány évtized alatt juttatjuk vissza a légkörbe, ami a fokozódó üvegházhatás révén globális klímaváltozást eredményez. Így az emberiség előtt álló egyik legfontosabb feladat a fosszilis energiahordozók minél előbbi, a még meglévő készletek teljes felhasználását megelőző kiváltása új, széles körűen használható, környezetbarát, lehetőség szerint megújuló forrásból származó energiahordozókkal.

Ezeket a követelményeket egyszerre elégíti ki a molekuláris hidrogén, amely a legtisztább energiahordozó, mivel elégetésének, a belőle történő energiafelszabadításnak a végterméke víz. A hidrogén tárolható és szállítható, különböző területeken, például üzemanyagként való felhasználására már jelenleg is rendelkezésre állnak technológiák. A hidrogén előállítható biológiai úton hidrogenáz enzimek segítségével. Ez alapján minden olyan mikroorganizmusnak fokozott biotechnológiai jelentősége lehet, amely anyagcsere folyamatai során képes (bio)hidrogént termelni.

A hidrogéntermelő mikroorganizmusok közt nagy jelentőségűek a hipertermofil fajok, mivel ezek hidrogenázai általában különösen stabil, nagy aktivitású enzimek, amelyek sejtmentes rendszerekben is eséllyel használhatók hidrogén előállításra. Kiemelkedő hidrogéntermelő képességű hipertermofil mikrobákat a *Thermococcus* és *Pyrococcus* fajok közt találhatunk.

A sekélytengeri vulkanikus hőforrások környékéről izolált *Thermococcus litoralis* egy anaerob, heterotróf archaebaktérium, amely a hipertermofil élőlények legrészletesebben vizsgált csoportjába tartozik. Szénhidrátokat és peptideket képes tápanyagforrásként felhasználni, amelyek lebontásához kapcsolódóan nagy mennyiségű hidrogént termel, ilyen formában távolítva el a sejtekből a fermentatív

anyagcsereutak oxidatív lépéseiben felszabaduló felesleges redukáló erőt. A sejtekben általában léteznek alternatív utak is az elektronok eltávolítására, mint például az elemi kén redukciója, amelyek ismerete különösen fontos, mivel az ezeken keresztül távozó elektronok miatt csökken a mikróbák hidrogéntermelő képessége. A *T. litoralis*-ból korábban citoplazmatikus és membrán kötött hidrogenázokat is jellemeztek, kén reduktáz enzimet azonban eddig még nem írtak le ebben a fajban.

Stabil enzimei, hidrogéntermelő képessége, valamint gyors és egyszerű nevelhetősége alapján a *T. litoralis*-nak komoly biotechnológiai jelentősége van. Csoportunkban korábban kidolgoztunk egy eljárást, amely állati eredetű fehérjét tartalmazó veszélyes hulladékokból fejleszt biohidrogént. A rendszerben a *T. litoralis* hatékonyabb hidrogéntermelőnek bizonyult, mint a részletesen jellemzett hidrogén anyagcserével rendelkező közeli rokona, a *Pyrococcus furiosus*. Ez alapján feltételezhető volt, hogy a hidrogéntermelés háttérében álló, a sejtek redox egyensúlyát fenntartó anyagcsere folyamatokban különbségek lehetnek a törzsek közt. Ezek megismerése szükségessé tette a *T. litoralis* hidrogén és kén anyagcseréjében részt vevő, korábbról nem ismert enzimek azonosítását, vizsgálatát.

A fehérjék funkciójának hatékony vizsgálatát, a sejtek célzott genetikai módosítását lehetővé tevő módszerek a *T. litoralis* esetében még nem állnak rendelkezésre. Hipertermofil mikroorganizmusokon használható genetikai rendszerek kidolgozását jelentősen megnehezíti, hogy ezek minden elemének működőképességnek kell lennie a sejtek magas növekedési hőmérsékletén. Megbízhatóan használható, célzott géntörzsek megvalósítására alkalmas rendszert a hipertermofil mikróbák közül eddig csak a *Thermococcus kodakaraensis*-re sikerült kidolgozni, amely uracil auxotróf sejtek komplementálására épülő szelekciós módszert alkalmaz. Feltételezéseink szerint, a törzsek közti közeli rokonság alapján, hasonló rendszer *T. litoralis* esetében is megvalósítható.

## Célkitűzések

Munkám fő célja a *T. litoralis* hidrogéntermelése mögött álló anyagcsere folyamatok korábbinál részletesebb megismerése volt, mivel ezek az ismeretek reményeim szerint megalapozhatják a mikroorganizmus jövőbeni hatékonyabb felhasználását biológiai hidrogéntermelő rendszerekben. Ehhez célul tűztem ki a *T. litoralis* hidrogén és kén anyagcseréjében szerepet játszó enzimek azonosítását, ezeknek a *P. furiosus* hasonló folyamataiban részt vevő fehérjéivel való összehasonlítását, és a fajok közt meglévő esetleges különbségek feltárását.

Kísérletet tettem továbbá egy a *T. litoralis* esetében alkalmazható hipertermofil genetikai rendszer kidolgozására, az ehhez szükséges uracil auxotróf *T. litoralis* törzsek izolálására.

## Módszerek

A *T. litoralis* géneket hordozó kromoszómális fragmenteket részleges genomi DNS könyvtárak átvizsgálásával azonosítottam, majd nukleotidsorrendjüket meghatároztam. A DNS manipulációs eljárásokat az általános gyakorlatnak megfelelően végeztem. Az azonosított gének transzkripció kezdőpontjait primer extenziós módszerrel határoztam meg, transzkripció szerveződésüket reverz transzkripció kapcsolt PCR-rel vizsgáltam. Rekombináns fehérje termeltetésére a laborunkban korábban kifejlesztett pMHE vektort használtam, és a FLAG-tag és Strep-tag II toldalékokkal ellátott NsoC fehérjét affinitás kromatográfiával tisztítottam, natív molekulatömegét gélszűrés kromatográfiával határoztam meg. A tisztított fehérje abszorpció tulajdonságait UV-látható spektroszkópiával vizsgáltam, kofaktorát vékonyréteg kromatográfiával azonosítottam. A tisztított NsoC fehérjén és *T. litoralis* sejtfrakciókon többek között kén reduktáz, oxigén reduktáz és hidrogenáz aktivitásméréseket végeztem. Az enzim ciszteinjeinek a katalitikus aktivitásban

betöltött szerepét helyspecifikus mutagenézis technikával vizsgáltam. A szekvenciaadatokat számítógéppel elemeztem.

## Eredmények

A *T. litoralis* hidrogén és kén anyagcseréjében részt vevő újabb enzimek azonosításában és a faj esetében használható hipertermofil genetikai rendszer kidolgozásában a következő eredményeket értem el:

1. A *T. litoralis* DSM5473 törzsből izoláltam egy 12 kilobázis hosszú kromoszómális fragmentet amelyen azonosítottam egy négy génből felépülő operont (*hyh2BGDA*), ami igazolta, hogy a faj rendelkezik egy második citoplazmatikus hidrogenázzal, a szolubilis hidrogenáz II enzimmal. A kísérleteimben vizsgált *T. litoralis* törzsből azonban a hidrogenáz katalitikus centrumát hordozó alegység génjében történt mutáció következtében az enzim nem működőképes. Igazoltam, hogy a gének egy transzkripcionális egységet alkotnak, és meghatároztam a transzkripció starthelyét. A gének előtt archaebakteriális promótert azonosítottam.

2. Kimutattam, hogy a *T. litoralis* DSM5474 törzs *hyh2A* génje nem tartalmazza az enzimet működésképtelenné tevő mutációt. A törzs sejtextraktumainak  $\text{NAD}^+$  redukáló hidrogenáz aktivitása igazolta az aktív szolubilis hidrogenáz II enzim jelenlétét a sejtekben.

3. A *hyh2* operontól 5' irányban elhelyezkedő genomai régió azonosítottam négy gént (*nsoABCD*, NADPH-függő kén oxidoreduktáz), amelyek egy transzkriptumon íródnak át, ami valószínűsíti, hogy a géntermékek funkcionálisan kapcsolatosak. A transzkripció starthelyét és az operon promóter szekvenciáit azonosítottam. Az *nso* géntermékek valószínűsíthetően egy újszerű összetételű,

eubakteriális eredetű, az archaeobaktériumok közt csak két *Thermococcus* fajban megtalálható fehérjekomplexet képeznek. A származtatott fehérje szekvenciákban *in silico* módszerekkel nukleotid- és vas-kén klaszter kötőhelyeket azonosítottam. Leírtam egy, az NsoC fehérjére és homológjaira jellemző doménstruktúrát, amely evolúciós kialakulásának mechanizmusára javaslatot tettem.

4. Az NsoC fehérje rekombináns, C-terminálisához FLAG-tag és Strep-tag II peptideket fuzionáltatott formáját *E. coli*-ban termeltettem, majd affinitás kromatográfiával tisztítottam. Kimutattam, hogy az NsoC fehérje egy nem-kovalensen kötött, redox aktív FAD kofaktort tartalmaz.

5. Kimutattam, hogy az NsoC fehérje egy kénreduktáz aktivitású enzim, ami specifikusan NADPH-t használ elektrondonor molekulaként. Az enzim képes továbbá oxigént, diszulfid kötést, viologén festékeket is redukálni. A reakciók kinetikai állandóit meghatároztam.

6. Kimutattam, hogy az NsoC fehérje egyetlen ciszteinjének sincs önmagában alapvető szerepe az enzim katalitikus működésében, ami más kénreduktáz aktivitással bíró enzimekétől eltérő katalitikus mechanizmusra utal az esetében.

7. A *T. litoralis* sejtekből a citoplazma frakcióhoz kötődő NADPH és NADH függő kénreduktáz aktivitásokat mutattam ki.

8. Az Nso komplex fiziológiai szerepére javaslatot tettem, aminek alapján a komplex a *T. litoralis* sejtek  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  egyensúlyának kénfüggő fenntartásában, valamint az oxidatív stressz elleni védekezésben játszhat szerepet.

9. *T. litoralis*-ből izoláltam egy 6 kilobázis hosszú kromoszómális fragmentet, amelyen azonosítottam az orotsav foszforiboziltranszferáz enzimet kódoló *pyrE* gént, valamint három további pirimidin bioszintézisben szerepet játszó enzim génjeit, amelyek egy operonba rendeződnek (*pyrBICDID2*).

10. Egy pozitív szelekciós módszerrel 5-fluoroorotsav rezisztens, stabilan uracil auxotróf *T. litoralis* törzseket izoláltam. Kimutattam, hogy a törzsek auxotrófiáját mindegyikük esetében ugyanaz, a *pyrE* génjükben bekövetkezett mutáció okozta.

### **A dolgozat témájához szorosan kapcsolódó közlemények**

**Tóth A.**, Takács M., Groma G., Rákhely G., Kovács K.L. (2008) A novel NADPH-dependent oxidoreductase with a unique domain structure in the hyperthermophilic Archaeon, *Thermococcus litoralis*. *FEMS Microbiol. Lett.*, közlésre elfogadva

**Tóth A.**, Takács M., Rákhely G., Kovács K.L. (2006) A novel type sulfur reductase in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis*. Előadás: Magyar Mikrobiológiai Társaság 2006. évi Naggyűlése, október 18 – 20., Keszthely

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

## **A dolgozat témájához kapcsolódó közlemények**

Takács M., **Tóth A.**, Bogos B., Varga A., Rákhely G., Kovács K.L. (2008) Formate hydrogenlyase in the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus litoralis*. *BMC Microbiology*, publikálás alatt

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.* 69:404-10

## **További közlemények**

Kovács K.L., Kovács Á.T., Maróti G., Bagi Z., Csanádi Gy., Perei K., Bálint B., Balogh J., Fülöp A., Mészáros L.S., **Tóth A.**, Dávid R., Latinovics D., Varga A., Rákhely G. (2005) Improvement of biohydrogen production and intensification of biogas formation. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 3: 321-330

Kovács K.L., Bagi Z., Bálint B., Balogh J., Dávid R., Fodor B.D., Csanádi Gy., Hanczár T., Kovács Á.T., Latinovics D., Maróti G., Mészáros L., Perei K., **Tóth A.**, Rákhely G. (2004) Microbial hydrogen metabolism and environmental biotechnology. In: European Symposium on Environmental Biotechnology (Ed. W. Verstraete) Taylor and Francis, London. ISBN 90 5809 653 X, pp. 155 – 158

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



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

Dahl C., Rákhely G., Pott-Sperling A.S., Fodor B., Takács M., **Tóth A.**, Kraeling M., Györfi K., Kovács Á., Tusz J., Kovács K.L. (1999) Genes involved in hydrogen and sulfur metabolism in phototrophic sulfur bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 180 (2): 317 – 24

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

Perei K., Bagi Z., Bálint B., Csanádi Gy., Hofner P., Horváth L., Kardos Gy., Magony M., Rákhely G., Román Gy., **Tóth A.**, Zsíros Sz. és Kovács L. K. (2004) Mikrobák környezetvédelmi biotechnológiai hasznosításra, *Biokémia* 28:54-58.

### **Magyarországon bejelentett szabadalom**

Bálint B., **Tóth A.**, Rákhely G., Perei K., Bagi Z., Pónya B., Kovács L. K. Mikrobiológiai eljárás keratintartalmú hulladékok lebontására, az eljárással előállított biomassza, és a biomassza alkalmazása mikroorganizmusok tápközegeként, P0203998, 2002