

A HYN HIDROGENÁZ ALEGYSÉGEINEK VIZSGÁLATA
***THIOCAPSA ROSEOPERSICINA* BBS-BEN**

Ph.D. tézisek

Palágyi-Mészáros Lívია Sarolta

Témavezetők:

Dr. Rákhely Gábor
Prof. Kovács Kornél

Szegedi Tudományegyetem, Biotechnológiai Tanszék
MTA Szegedi Biológiai Központ, Biofizikai Intézet

Szeged

2009.

Bevezetés

Napjaink egyik legnagyobb problémája az emberiség egyre növekvő energiaigényének kielégítése. A fosszilis energiahordozók azonban kimerülőben vannak, ezért megnőtt az igény az alternatív, megújuló energiaforrások iránt. A legnagyobb mennyiségben rendelkezésünkre álló alternatív energiaforrás a napenergia, amelyet a fotoszintetizáló élőlények képesek hasznosítani és segítségével szervesetlen szénvegyületeket szerves anyagokká alakítani. A napenergia koncentrációja és tárolása azonban nem könnyű feladat. A tárolás egyik magától értetődő megoldása, hogy átalakítjuk környezetbarát, tárolható energiahordozóvá, mint pl. biogáz, bioetanol vagy biohidrogén. Ha az üvegház hatást kiváltó CO₂ kibocsátási problémákat is figyelembe vesszük, ezek közül az egyik legjobb megoldásnak a hidrogén ígérkezik.

A hidrogén biológiai úton történő előállításának kulcsenzimeit a hidrogenázok, melyek a hidrogén reverzibilis oxidációját katalizálják. Ezen enzimek segítségével megoldható lenne a hidrogén gazdaságos előállítása, azonban ismernünk kell az enzimek pontos működését, valamint módosítanunk kell őket a jobb és hatékonyabb működés érdekében, meg kell teremtenünk az ipari léptékű felhasználáshoz szükséges körülményeket.

A hidrogenáz enzimeket három osztályba sorolják az aktív centrum fémtartalmát alapul véve. Ezek a [FeFe], [NiFe] és a Hmd hidrogenázok. Csoportunk [NiFe] hidrogenázokkal foglalkozik.

A [NiFe] hidrogenázok két alegységből álló heterodimert képeznek. A nagy alegység tartalmazza az aktív centrumot. Az aktív centrum (NiFe (CN)₂ (CO)) fémcentrumot tartalmaz. A CO és a két CN ligand a vashoz kapcsolódik. Az fémcentrum két, a nagy alegység N- illetve C-terminálisán található CxxC motívumokon keresztül kapcsolódik a fehérjeszerkezethez. A kis alegységben található vaskén [Fe-S] centrumok vesznek részt az elektronok továbbításában az aktív centrum és a fiziológiai elektron akceptorok/donorok között. A [NiFe] hidrogenázokban [4Fe-4S] és [3Fe-4S] kockák biztosítják az elektronok áramlását az aktív centrumtól a redox partner felé.

A hidrogenázok összeszerelődése meglehetősen bonyolult folyamat, amely számos kisegítő fehérjét igényel.

A *Thiocapsa roseopersicina* BBS fototróf bíbor kénbaktérium négy, működő hidrogenáz enzimet tartalmaz. Kettő közülük a membránhoz kapcsolódik (Hyn, Hup), kettő pedig a citoplazmában található (Hox1, Hox2).

A Hyn hidrogenáz különleges stabilitási tulajdonságokkal rendelkező hidrogén termelő és hidrogén visszavevő enzim. Az enzimet kódoló operon szerkezete szokatlan, ugyanis a kis és a nagy alegység génje közé két nyitott leolvasási keret illeszkedik, az *isp1* és *isp2*. Az *in silico* vizsgálatok alapján az *isp1* gén b-típusú hem-kötő transzmembrán fehérjét kódolhat, míg az *isp2* a metanogenezisben részt vevő heterodiszulfid redukázokkal mutat homológiát.

Munkám során a Hyn hidrogenáz redox partnereinek azonosítása, valamint a *hyn* gének környezetében előforduló gének és géntermékek fiziológias szerepének vizsgálata volt célom.

Módszerek

A DNS manipulációs eljárásokat a gyártók utasításainak megfelelően végeztem. *E. coli*-ba a plazmidokat transzformálással, *T. roseopersicina*-ba konjugációval juttattam be.

A *hyn* gén klaszter transzkripcionális szerveződését RT-PCR segítségével vizsgáltam. Azt, hogy az *isp1,2* gének valódi fehérjéket kódolnak, izotópos expressziós analízissel bizonyítottam. Az Isp2 fehérjét oligohisztidin peptiddel fúzináltatva termeltettem túl *Escherichia coli*-ban, majd affinitás-kromatográfiával tisztítottam.

Az Isp1, Isp2 fehérjék funkcióját *in-frame* deléció segítségével vizsgáltam. A kapott mutáns törzseket hidrogenáz aktivitás méréssel jellemeztem, minden esetben mérve a Hyn enzim hidrogén fejlesztő, illetve hidrogén felvevő aktivitását *in vivo* és *in vitro* körülmények között.

Az Isp2 fehérjében található erősen konzervált aminosavak vizsgálatához pontmutánsokat hoztam létre: az egyes aminosavakat egy teljesen más karakterű aminosavra cseréltem le és a mutáció hatását vizsgáltam a Hyn hidrogenáz aktivitására.

A *T. roseopersicina* genomszekvenálásához hibrid módszert használtunk. A genomikai munkák során a shotgun könyvtár

készítéséhez az Invitrogen által forgalmazott PCR4Blunt klónozó kitet (Kat. szám: K7010-01), a kozmid könyvtár készítéséhez az Epicentre pWEB-TNC kitjét (Kat. szám: TNC9401) használtam a gyártók instrukciói szerint. Ezeket automatizált Sanger módszerrel szekvenáltuk. A munka későbbi fázisában a 454 FLX új generációs genom szekvenátorral is végeztünk futtatásokat és a két módszerrel kapott szekvenciákat összefésültük.

Eredmények

Munkám során a *Thiocapsa roseopersicina* Hyn hidrogenázának mindeddig kevésbé ismert Isp1, Isp2 alegységeit jellemeztem. A Hyn hidrogenáz kiemelkedő stabilitási tulajdonságokkal rendelkező membránkötött enzim, amely mind hidrogén termelő, mind hidrogén felvevő irányban képes működni.

Eredményeim a következők:

RT-PCR segítségével bizonyítottam, hogy a *Thiocapsa roseopersicina* genomjában egymás mellett található *hynS-isp1-isp2-hynL* gének egy operont alkotnak.

Expressziós analízis segítségével bizonyítottam, hogy a kis alegység és a nagy alegység közé beékelődött két potenciális cisztron két valódi fehérjét kódol.

A *hynS* gén előtt felfedeztem egy gént (*hynH*), amelynek fehérje terméke szerepet játszhat a Hyn hidrogenáz érésében és transzlokációjában.

Heterológ gazdában, *Escherichia coli*-ban túltermeltettem az Isp2 fehérjét, amit a fehérjéhez fúzionáltatott His-tag segítségével fémkelátoló affinitás kromatográfiával tisztítottam.

Az Isp1, Isp2 fehérjék funkciójának vizsgálata érdekében genomiális mutánsokat készítettem, melyekben az Isp1 génjét külön, valamint az Isp1 és az Isp2 génjét egyaránt inaktiváltam. A mutánsokon végzett aktivitás mérések eredményeképpen megállapítottam, hogy az Isp1,2 fehérjékre szükség van a Hyn hidrogenáz fiziológias aktivitásához. Ezáltal bizonyítást nyert, hogy az Isp1, Isp2 fehérjék *in vivo* funkciója a Hyn hidrogenázhoz kapcsolódik.

Különböző sejtfrakciókon végzett aktivitás mérések segítségével bizonyítottam, hogy az Isp fehérjék mutációja nem befolyásolja a Hyn hidrogenáz lokalizációját, az enzim a membránban marad akkor is, ha az Isp fehérjék nincsenek jelen a sejtekben, az Isp fehérjéknek tehát nincs membránhoz kötő szerepük a Hyn hidrogenáz esetén.

Az Isp2 fehérjében található konzervatív aminosavakat pontmutációval kicseréltem egy más karakterű aminosavra, megvizsgáltam, hogy az egyes aminosavaknak milyen hatása van a

Hyn aktivitására. Megállapítottam, hogy vannak olyan aminosavak, melyek mutációjá megszünteti vagy lecsökkenti a Hyn hidrogenáz aktivitását. Ezek a kísérletek további bizonyítékként szolgálnak a két fehérje funkcionális kapcsoltságára.

Tanulmányoztam a Hyn hidrogenáz és a kénanyagcsere kapcsolatát, megállapítottam, hogy a tápoldat tioszulfát koncentrációjának növekedése befolyásolja a Hyn hidrogenáz hidrogén termelését, ami bizonyíték arra, hogy a Hyn és a kénanyagcsere *T. roseopersicina*-ban kapcsolatban van egymással.

A *T. roseopersicina* genomszekvenálásához “shutgun” és kozmid könyvtárakat készítettem. 30556 db Sanger típusú szekvenciát kombináltuk az új generációs 454 technológiával. Ennek az ún. hibrid genomszekvenálási stratégia segítségével a *T. roseopersicina* genomszekvenciájának 98%-a ismertté vált.

A kozmid könyvtárban azonosítottam többek között a glutation-amid reduktázt kódoló géneket. A glutation-amid reduktáz olyan enzim, amely kapcsolatot biztosíthat a Hyn hidrogenáz és a kénanyagcsere között.

KÖZLEMÉNYEK

A dolgozat alapjául szolgáló közlemény

Palágyi-Mészáros LS, Maróti J, Latinovics D, Balogh T, Klement E, Medzihradszky KF, Rákhely G, Kovács KL. (2009) Electron-transfer subunits of the NiFe hydrogenases in *Thiocapsa roseopersicina* BBS. FEBS J. 276:164-74.

A dolgozat tematikájával kapcsolatos egyéb közlemények

Kovács AT, Rákhely G, Balogh J, Maróti G, Cournac L, Carrier P, Mészáros LS, Peltier G, Kovács KL. (2005) Hydrogen independent expression of hupSL genes in *Thiocapsa roseopersicina* BBS. FEBS J. 272:4807-16.

Kovács KL, Kovács AT, Maróti G, Mészáros LS, Balogh J, Latinovics D, Fülöp A, Dávid R, Dorogházi E, Rákhely G.(2005) The hydrogenases of *Thiocapsa roseopersicina*. Biochem Soc Trans. 33:61-3.

Fodor BD, Kovács AT, Csáki R, Hunyadi-Gulyás E, Klement E, Maróti G, Mészáros LS, Medzihradszky KF, Rákhely G, Kovács KL.(2004)

Modular broad-host-range expression vectors for single-protein and protein complex purification. *Appl Environ Microbiol.* 70:712-21.

Kovács KL, Kovács ÁT, Maróti G, Bagi Z, Csanádi Gy, Perei K, Bálint B, Balogh J, Fülöp A, Mészáros LS, Tóth A, Dávid R, Latinovics D, Varga A, Rakhely G. (2004) Improvement of biohydrogen production and intensification of biogas formation. *Reviews in Environmental Science & Bio/Technology* 3: 321–330.