

**A membránkötött Hyn [NiFe]  
hidrogenáz enzim struktúra-funkció  
analízise**  
*Thiocapsa roseopersicina*-ban

Ph.D. értekezés tézisei

Szóri-Dorogházi Emma

Témavezetők:

Prof. Kovács L. Kornél

*tanszékvezető, egyetemi tanár*

Dr. Rákhely Gábor

*tanszékvezető helyettes, egyetemi docens*

Dr. Maróti Gergely

*csoportvezető*

Biológia Doktori Iskola

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

Szeged

2012

# Bevezetés

Napjaink ipari technológiai elsősorban a fosszilis energiahordozók felhasználására épülnek, viszont ezen készleteink kimerülőben vannak, illetve használatukkal jelentősen károsítjuk környezetünket is (üvegházhatás, levegőszennyezés, vízszennyezés). Mindez alternatív, tiszta és megújuló energiaforrások, alternatív energiahordozók kutatására sarkall bennünket. Számos lehetséges megoldás közül a hidrogén gáz ( $H_2$ ) igazán ígéretes jelöltnek tűnik, mivel elégetésekor víz keletkezik, ami nem károsítja a környezetet. Molekuláris hidrogén előállítható biológiai rendszerekkel is, a különböző élőlényben megtalálható hidrogenáz illetve nitrogenáz enzimek segítségével.

A hidrogenázok, mint a hidrogén metabolizmus kulcsenzimeik, a molekuláris hidrogén reverzibilis, heterolitikus hasítását katalizálják. Az ismert hidrogenázok többsége  $[NiFe]$ , vagy  $[FeFe]$  hidrogenáz, míg néhány metanogén organizmusban FeS-klasztert nem tartalmazó, ún.  $[Fe]$  hidrogenázok találhatóak. A  $[NiFe]$  hidrogenázok általában egy nagy és egy kis alegységből álló heterodimer fehérjék. A nagy alegység tartalmazza a heteroatomos aktív centrumot, melynek Fe ionjához nem fehérjetermészetű csoportok is kapcsolódnak: általában 1 CO és 2  $CN^-$  ligandum. A kis alegység az aktív centrum és az *in vivo* elektron donor/akceptor közötti elektrontranszportot végző FeS-klasztereket foglalja magába.

Modellorganizmusunk, a *Chromatiaceae* családba tartozó, Gram-negatív, fotoszintetizáló, bíbor kénbaktérium, a *Thiocapsa*

*roseopersicina* BBS. Négy funkcionálisan aktív hidrogenázzal rendelkezik (Hyn, Hup, Hox1, Hox2), melyek *in vivo* szerepükben, sejten belüli lokalizációjukban és felépítésükben különböznek egymástól.

A Hyn hidrogenáz egy membránkötött, kétirányú enzim, mely kiemelkedő stabilitási tulajdonságokkal rendelkezik, ezáltal ígéretes jelöltnek tűnik biotechnológiai alkalmazásokra. Ahhoz azonban, hogy képesek legyünk mikroorganizmusokkal, vagy a belőlük izolált enzimekkel folyamatosan nagy mennyiségű hidrogént előállítani, szükséges feltérképeznünk azokat a szerkezeti elemeket, melyek a [NiFe] hidrogenázokra általánosan jellemzőek, és meghatározott funkciókért lehetnek felelősek.

Az enzimek strukturális elemei és az egyes enzimátikus funkciók kapcsolatának vizsgálatához használható módszer lehet az irányított mutagenézis, ami által lehetőség nyílik egy-egy konkrét aminosav vagy motívum szerepének specifikus vizsgálatára.

Munkám elsődleges célja volt a [NiFe] hidrogenázok nagy alegységében megfigyelt nagyon konzervált, hisztidinekben gazdag (HxHxxHxxHxH) szekvencia motívum részletes vizsgálata annak kiderítésére, hogy ez a régió mely enzimtulajdonságok kialakulásáért lehet felelős. Céлом volt továbbá a szakirodalomból ismert, az általam megfigyelt motívum második konzervált aminosavát is magába foglaló, alternatív protontranszfer útvonal és a HxHxxHxxHxH szekvencia részlet közötti kapcsolat vizsgálata.

## Módszerek

A DNS manipulációs eljárásokat az általános gyakorlatnak, illetve az egyes gyártók utasításainak megfelelően végeztem. A plazmidokat *E. coli*-ba transzformálással, *T. roseopersicina*-ba konjugációval juttattam be.

A hisztidin-gazdag motívum és a feltételezett protoncsatornát alkotó aminosavak szerepét irányított mutagenézissel vizsgáltam. Ezen kísérletekhez a Hyn hidrogenázt használtam modellként. A mutációs konstrukciókat egy Hyn, Hup és Hox1 enzimeket a genomról aktívan nem termelő *T. roseopersicina* törzsbe juttattam vissza, így specifikusan tudtam vizsgálni a kialakított mutációk hatását. Részletesen tanulmányoztam a mutáns törzsek hidrogénfejlesztő és hidrogénfelvevő képességének a mutáció következtében bekövetkező változásait mind *in vivo* (élő sejteken) mind *in vitro* (sejtpreparátumokon) körülmények között. Western hibridizációs módszert használtam a mutáns fehérjék proteolitikus stabilitásának vizsgálatához. Bioinformatikai módszerek segítségével feltérképeztük a hidrogenázok katalitikus ciklusa során végbemenő protontranszferet lebonyolító útvonalakat, illetve ezen szubmolekuláris útvonalak és a hisztidin gazdag motívum egyes aminosavainak kapcsolatát.

## Eredmények

A rendelkezésre álló, főleg a *Desulfovibrio* génusból származó [NiFe] hidrogenázok kristályszerkezetének elemzésével számos konzervált szekvenciárészlet vagy konkrét aminosav az enzim működésében betöltött szerepét írták már le. Munkám során ezekhez hasonlóan, a *T. roseopersicina* periplazmatikus HynSL hidrogenázát használva modellként a [NiFe] hidrogenázokra általánosan jellemző konzervált struktúrákat kerestem. A korábbiakban még nem jellemzett, erősen konzervált hisztidin-gazdag (HxHxxHxxHxH) motívumot irányított mutagenézissel vizsgáltam, s kísérleteim eredményei az alábbi állításokban foglalhatóak össze:

A HxHxxHxxHxH motívum szinte minden membránkötött [NiFe] hidrogenáz nagy alegységében megtalálható, viszont a szolubilis hidrogenázokban ezen hisztidinek közül csupán kettő (a második és a negyedik) helye konzervált.

A HynSL hidrogenáz nagy alegységében is megtalálható, konzervált, hisztidin-gazdag motívum aminosavainak mutációjából kiderült, hogy csak a His104 cseréje befolyásolta jelentősen az enzim aktivitását.

A vizsgált hisztidin-gazdag motívum konzervált aminosavainak alaninnal való helyettesítése az enzim sejten belüli elhelyezkedését nem változtatja meg.

A membránkötött [NiFe] hidrogenázok kristályszerkezeteinek bioinformatikai elemzésével az enzimek nagy alegységében azonosítottunk egy hidrogénhid kötésekkel összekapcsolódó molekulaláncolatot, melyben szerepel a korábbiakban vizsgált hisztidin-gazdag motívum második tagja is (His104). Ezen hálózat - tulajdonságaiból adódóan - egy lehetséges protontranszfer útvonal szerepét töltheti be a hidrogenáz enzimek működése során.

A feltételezett protontranszfer csatorna konzervált aminosavainak mutagenézise befolyásolta a Hyn hidrogenáz aktivitását.

Western hibridizációs kísérletekkel sikerült igazolni a feltételezett protoncsatorna két tagjára vonatkozóan (Asp103, His104), hogy a mutáns, érett HynL mennyisége a sejtekben megegyezik az ugyancsak érett vad típusú enzim mennyiségével. Ezzel bizonyítottam, hogy a kérdéses aminosavak cseréjének az enzim bioszintézisére nincs hatása, így a mutáció feltehetően a megfelelően átírodott HynSL fehérjekomplex működésében okoz változást.

Az általunk javasolt protontranszfer útvonalnak az aktív centrum Ni atomjához legközelebb eső tagja (Arg487) esetében bebizonyosodott, hogy hiánya nem csupán az enzim aktivitására, hanem már annak érési folyamatára is hatással volt. Az Arg487 feltehetően az aktív centrumban lévő Fe ionhoz kapcsolódó CN<sup>-</sup> ligandumok koordinációjának módosításával befolyásolta a fehérje érési

folyamatait, ezáltal hatva a [NiFe] hidrogenázok katalitikus folyamataira is.

Dolgozatomban egy, a korábbiakban már leírt, főleg elméleti módszerekkel meghatározott lehetséges protontranszfer útvonallal részben átfedő, új protontranszfer láncolatot javasoltam.

A bioinformatikai módszerekkel felderített, és kísérletesen is igazolt modell egy olyan lehetséges protoncsatornát jelent, mely a korábbiakban leírt útvonalakhoz képest a nagy alegységnek a kis alegységgel (mely az elektrontranszfer lezajlásának helyszíne) szembeni oldalán található.

Munkában elsőként sikerült a molekulamodellezésből származó eredményeket kísérletesen is (a javasolt protontranszfer útvonalat alkotó aminosavak szisztematikus kicserélésével) igazolni egy, a már jól ismert *Desulfovibrio* fajoktól eltérő, organizmusban is. Az általunk javasolt útvonal főbb jellemzői a *T. roseopersicina*-val közeli rokonságban lévő *Allochromatium vinosum* kristályszerkezetében is megfigyelhetők.

## Közlemények

### A dolgozat alapjául szolgáló közlemények:

**Emma Szóri-Dorogházi**, Gergely Maróti, Milán Szóri, Andrea Nyilasi, Gábor Rákhely, Kornél L. Kovács (2012) Analyses of the large subunit histidine-rich motif expose an alternative proton transfer pathway in [NiFe] hydrogenases, *Plos One* (**in press**); IF(2010): 4,411

**Dorogházi Emma**, Prof. Kovács L. Kornél, Dr. Rákhely Gábor. (2009) Analysis of a structural motif in the membrane-associated [NiFe] hydrogenases, *Acta Biologica Szegediensis*, **53**, 59;

### Egyéb közlemények:

K.L. Kovács, Á.T. Kovács, G. Maróti, L.S. Mészáros, J. Balogh, D. Latinovics, A. Fülöp, R. Dávid, **E. Dorogházi**, G. Rákhely. (2005) The Hydrogenases of *Thiocapsa roseopersicina*, *Biochemical Society Transactions*, **33**, 61-3; IF(2005): 3,099

Gergely Maróti, Gábor Rákhely, Judit Maróti, **Emma Dorogházi**, Eva Klement, Katalin F. Medzihradzsky, Kornél L. Kovács. (2010) Specificity and selectivity of HypC chaperonins and endopeptidases in the molecular assembly machinery of [NiFe] hydrogenases of



*Thiocapsa roseopersicina*, *International Journal of Hydrogen Energy* **35**, 3358-3370; IF(2010): 4,053

K.L. Kovács, Z. Bagi, E. Kovács, G. Maróti, **E. Szóri-Dorogházi**, N. Ács, R. Wirth, R. Tengölics, A. Fülöp, G. Rákhely. (2011) Industrial microbiology for the production of biohydrogen and biogas, *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* **58**, 171-172; IF(2010): 0,625

## Társszerzői lemondó nyilatkozat

Kijelentjük, hogy Szőri-Dorogházi Emma “A membránkötött Hyn [NiFe] hidrogenáz enzim struktúra-funkció analízise *Thiocapsa roseopersicina*-ban” című Ph.D téziseiben foglalt tudományos eredményeket tudományos fokozat megszerzéséhez nem használtuk fel, és későbbiekben sem fogjuk felhasználni.

Kijelentjük, hogy a tézisekben és az értekezésben szereplő és közösen publikált eredményekben Szőri-Dorogházi Emma szerepe meghatározó fontosságú volt.

Dr. Rákhely Gábor

Prof. Kovács Kornél

Dr. Maróti Gergely

Dr. Szőri Milán

Nyilasi Andrea

Szeged, 2012. 04. 05.