

Fotobiohidrogén termelésében szerepet játszó enzimek bioszintézise és metabolikus kontextusa

Ph.D. értekezés tézisei

Nyilasi Andrea

Témavezetők:

Dr. Rákhely Gábor

Prof. Kovács L. Kornél

Biológia Doktori Iskola

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

Szeged
2014

BEVEZETÉS

Napjainkban az emberiség egyik legnagyobb problémája, hogy a fosszilis energiahordozók keletkezése sokkal lassabb, mint felhasználásuk sebessége, mindemellett felhasználásuk rendkívül környezetromboló hatású. Ma már tényként kezelhetjük, hogy az antropogén hatások igenis felelősek a klímaváltozásért, éppen ezért, ha lehetőség van rá, minden tudományos eszközt meg kell ragadni, hogy minél előbb környezetkímélő megoldásokat találjunk. Az egyik lehetséges megújuló energiaforrás a Nap, míg a hidrogén lehet a jövő energiahordozója, mivel eleget tesz olyan alapvető követelményeknek, amelyek a fosszilis energiahordozók felváltásához szükségesek, és hosszú távon képes fedezni az egyre növekvő energiaigényeket.

Molekuláris hidrogén előállítható különböző biológiai rendszerek segítségével napenergiából, az élő sejtekben található hidrogenáz és nitrogenáz enzimek segítségével.

Modell organizmusunk a fotoszintetizáló *Thiocapsa roseopersicina*, mely négy féle, funkcionálisan aktív [NiFe] hidrogenáz (Hyn, Hup, Hox1, Hox2) és egy nitrogenáz enzimmel is rendelkezik. A [NiFe] hidrogenázok bonyolult metalloenzimek, melyeknek komplex struktúrája sejten belül spontán módon nem tud kialakulni, hanem számos kisegítő fehérje összehangolt működésére van szükség. A hidrogenáz enzimek érésének kutatása során több kisegítő fehérjét sikerült azonosítanunk *T. roseopersicina*-ban. Az egyik ilyen kisegítő fehérje a HupK, melynek funkciójáról keveset tudunk, azonban homológjáról, a HoxV fehérjéről *R. eutropha*-ban bebizonyították,

hogy a membránkött hidrogenáz aktív centrumának összeszerelésében játszik fontos szerepet.

A HupK fehérje szekvenciáját összehasonlítottam a HoxV és a *T. roseopersicina* Hup hidrogenáz nagy alegységének szekvenciájával. Két olyan motívum is található, melyekben lévő négy cisztein mindegyik membránkött hidrogenáz nagy alegységben megtalálható, és az aktív centrum koordinálásáért felelős. Viszont a HupK és a HoxV fehérjékben csak kettőnek a helye konzervált (Cys54 és Cys378 a HupK-ban), a másik két ciszteint fenil-alanin helyettesíti (Phe51 és Phe381) a HupK-ban. Munkám elsődleges célja volt a HupK fehérjében megfigyelt erősen konzervált szekvencia motívum részletes vizsgálata annak kiderítésére, hogy ez a régió felelős-e a fehérje funkciójáért.

A fotoszintetikus baktériumok egy egészen változatos csoportja képes a szerves savakat szén- és energiaforrásként metabolizálni. Munkám célja az volt, hogy kiderítsem, a *T. roseopersicina* alkalmas-e erre a feladatra, és hogy összehasonlítsam a Hox1 és a nitrogenáz hidrogéntermelését négyféle potenciális szubsztrátból, az ecetsavból, a piroszőlősavból, a borostyánkősavból és a tejsavból.

MÓDSZEREK

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

A HupK és HoxV fehérjéket heterológ gazdáiban (*R. eutropha* és *T. roseopersicina*) expresszáltam és mértem az *in vitro* hidrogenáz aktivitást (mesterséges elektron akceptor jelenlétében).

A HupK kisegítő fehérje konzervált aminosavainak szerepét irányított mutagenézissel vizsgáltam. A Hup hidrogenáz *in vitro* hidrogén felvevő aktivitásán keresztül vizsgáltam az aminosav cserét tartalmazó HupK hatását a Hup hidrogenáz éérésére. Western hibridizációs módszert használtam a mutáns fehérjék proteolitikus stabilitásának vizsgálataihoz.

Gázkromatográffal határoztam meg a szerves savak (ecetsav, piroszólósav, borostyánkősav és tejsav) hatására termelt hidrogén mennyiségét. A tápoldat tioszulfát koncentrációjának változását spektrofotométerrel, szerves sav mennyiségének csökkenését HPLC-vel követtem nyomon. A nitrogenáz aktivitást acetilén redukciós módszerrel vizsgáltam.

EREDMÉNYEK

Munkám során a *T. roseopersicina*-ban lévő HupK kisegítő fehérje heterológ funkcionalitását és konzervált aminosavainak szerepét vizsgáltam. Továbbá tanulmányoztam a különböző szerves savak hatását a *T. roseopersicina* hidrogéntermelésére. Kísérleteim során a következő eredményeket értem el:

- I. A *R. eutropha* hoxV mutáns törzsét komplementáltam a *T. roseopersicina*-ból származó *hupK* génnel és mértem a membránkötött hidrogenáz *in vitro* aktivitását. Ezzel a kísérlettel bizonyítottam, hogy a HupK fehérje funkcionálisan konzervált annyira, hogy képes együttműködni a *R. eutropha* kisegítő fehérjével a hidrogenáz érése során. (1)

- II. Heterológ gazdában, a *hupK* mutáns *T. roseopersicina* törzsben sikeresen expresszáltam a HoxV fehérjét. A két membránkötött hidrogenáz *in vitro* aktivitása alapján elmondható, hogy a HoxV, mind a Hyn, mind a Hup hidrogenáz érésében részt tudott venni. (1)

- III. A HupK fehérjében található konzervált aminosavakat pontmutációval sikeresen kicseréltem egy más karakterű aminosavra, majd a Hup hidrogenáz *in vitro* hidrogénfelvevő aktivitásán keresztül megvizsgáltam, hogy ezeknek az aminosavaknak milyen hatása van a Hup érésére. (1)

- IV. Bizonyítottam, hogy a Cys54 jelentős szereppel bír a HupK fehérje megfelelő működésében, mivel alaninra való cseréje (*Tr* C54A) drasztikusan, 4%-ra lecsökkentette a Hup hidrogenáz aktivitását. Western hibridizációs módszerrel kiderítettem, hogy a C54A HupK kifejeződik, a pontmutáció csak kis mértékben befolyásolta a mutáns fehérjék proteolitikus stabilitását, tisztáztam, hogy a tapasztalt aktivitásbeli különbség nem magyarázható kizárólag a C54A HupK elégtelen expressziójával. (1)
- V. További pontmutások (*Tr* F51C/C54A és *Tr* C54A/F381C) vizsgálatával igazoltam, hogy sem az 51-es, sem pedig a 381-es pozícióba beépített cisztein nem volt képes helyettesíteni a Cys54 szerepét. (1)
- VI. A *Tr* C378A mutáns törzs csekély hidrogenáz-aktivitás csökkenéséből megállapítottam, hogy a 378-as ciszteinnek nincs jelentős szerepe a HupK működésében. (1)
- VII. Összehasonlítva a *Tr* C378A és a *Tr* C378A/F381C, valamint a *Tr* F51C és a *Tr* F51C/F381C mutáns törzsek aktivitását, arra a következtetésre jutottam, hogy a 381-es helyen lévő fenilalaninnak kitüntetett szerepe van a HupK működése során. Valamint a HupK fehérjében kialakított négy cisztein (*Tr* F51C/F381C) valószínűleg túl erősen köti a vasat ahhoz, hogy a $\text{Fe}(\text{CN})_2\text{CO}$ csoport át tudjon jutni a HupK-ról a Hup hidrogenáz nagy alegységére. (1)

- VIII. *In vivo* hidrogenáz-aktivitásméréssel bebizonyítottam, hogy a *T. roseopersicina* nem képes a Hox1 hidrogenáz enzimével hidrogént termelni az általam vizsgált egyik szerves savból sem.
- IX. Összehasonlítva a szerves savak nitrogeáz enzimre gyakorolt hatását arra a következtetésre jutottam, hogy kivétel nélkül, mindegyik szubsztrát jelentős mértékben megnövelte a termelt hidrogén mennyiségét a szerves sav mentes kontrollhoz képest, függetlenül a tioszulfát koncentrációtól. (2)
- X. A szubsztrát hasznosítási eredmények alapján megállapítható, hogy az ecetsavat, a piroszőlősavat, és a tejsavat 2 mM és 8 mM tioszulfát mellett volt képes a *T. roseopersicina* a fotoheterotróf növekedéséhez felhasználni. Ezeknél a tioszulfát mennyiségeknél a borostyánkősav nem befolyásolta a biomassza képzést. (2)
- XI. A dolgozatban vizsgált szerves savak közül a tejsav hatására termelődött a legtöbb hidrogén. A nitrogeáz aktivitás mérései alapján megállapítható, hogy a tejsav, mind az *in vivo* hidrogéntermelő, mind az *in vitro* acetilénredukáló aktivitását igen jelentős mértékben megnövelte.
- XII. A nitrogeáz alegységeinek expressziós vizsgálatával bebizonyítottam, hogy a tejsav fokozza azok kifejeződését.

KÖZLEMÉNYEK

A dolgozat alapjául szolgáló közlemények

- (1) **Andrea Nyilasi**, Gergely Maróti, Tímea Balogh, Kornél Lajos Kovács, Gábor Rákhely (2014) Heterologous functionality and roles of conserved cysteine motifs of the [NiFe]-hydrogenase accessory protein, HupK/HoxV, International Journal of Hydrogen Energy (in press); IF: 3.548
- (2) **Andrea Nyilasi**, Éva Molnos, Szabolcs Lányi, Iosif Nagy, Gábor Rákhely, Kornél L. Kovács (2013) Photofermentative production of hydrogen from organic acids by the purple sulfur bacterium *Thiocapsa roseopersicina*, International Journal of Hydrogen Energy 38:(14) pp. 5535-5544. IF: 3.548

Egyéb közlemények, konferencia kiadványok

- (3) Emma Szőri-Dorogházi, Gergely Maróti, Milán Szőri, **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 (4) Paper N°e34666. 11 p.; IF: 4,411
- (4) **Andrea Nyilasi**, Zsolt Horváth, Kornél L. Kovács, Gábor Rákhely (2013) Hydrogen production from lactate by a purple sulfur phototrophic bacterium, Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica 60:(Suppl. 1.) pp. 200-201.

- (5) Kovács Kornél, Fülöp András, Herbel Zsófia, **Nyilasi Andrea**, Rákhely Gábor (2010) Tiszta, megújuló energia a biohidrogén, Környezetvédelem XVIII.(2):20-21
- (6) **Andrea Nyilasi**, Gergely Maróti, Gábor Rákhely, Kornél L. Kovács. (2005) Investigation of HupK hydrogenase accessory protein in *Thiocapsa roseopersicina*, Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica 52, 113-114.
- (7) Éva Klement, Krisztina Buzás, Gergely Maróti, Barna Fodor, Ákos T. Kovács, Dóra Latinovics, Livia Mészáros, Réka Dávid, **Andrea Nyilasi**, Judit Balogh, Gábor Rákhely, Kornél L. Kovács, Katalin F. Medzihradzky. (2005) Mass spectral identification of interacting proteins in the biosynthesis of Ni-Fe hydrogenases, Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica 52, 75-76.
- (8) **Andrea Nyilasi**, Kornél L. Kovács, Gábor Rákhely (2009) Investigation of the maturation of NiFe hydrogenases in *Thiocapsa roseopersicina*, Acta Biologica Szegediensis, 53 (No. 1), 70
- (9) Éva Molnos, **Andrea Nyilasi**, Gábor Rákhely, Ovidiu Muntean, Kornél L. Kovács (2010) Photofermentative production of hydrogen by *Thiocapsa roseopersicina* from Simple organic substrates, Hungarian Journal of Industrial Chemistry, 38. (2), 117-121