

A hidrogenázok és a kénanyagcsere kapcsolatának jellemzése fototróf bíbor kénbaktériumokban

Ph.D. értekezés

Tengölics Roland

Biológia Doktori Iskola

Témavezető:

Dr. Rákhely Gábor



Szegedi Tudományegyetem, Biotechnológiai Tanszék

Szeged

2014

Tartalomjegyzék

MOTTÓ	5
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	6
BEVEZETÉS	9
A VILÁG ENERGIAELLÁTÁSA	9
A MEGÚJULÓ ENERGIAFORRÁSOK ÉS ENERGIAHORDOZÓK FELHASZNÁLÁSÁBAN REJLŐ LEHETŐSÉGEK ÉS NEHÉZSÉGEK	9
A HIDROGÉN, MINT MEGÚJULÓ ENERGIAHORDOZÓ	11
IRODALMI ÁTTEKINTÉS	12
A HIDROGÉNTERMELÉSBEN SZEREPELT JÁTSZÓ ENZIMEK	12
A HIDROGENÁZOK CSOPORTOSÍTÁSA ÉS ÁLTALÁNOS JELLEMZÉSE	12
A membránkötött hidrogenázok	14
A reverzibilis [NiFe]-hidrogenázok	15
A BIOHIDROGÉN TERMELÉS LEHETSÉGES MÓDJAI	16
A FOTOTRÓF BÍBOR BAKTÉRIUMOK	17
FOTOSZINTETIKUS ENERGIAKONVERZIÓ BÍBOR KÉNBAKTÉRIUMOKBAN	17
KÉNANYAGCSERE BÍBOR KÉNBAKTÉRIUMOKBAN	19
A szulfid oxidációja, a tioszulfát asszimilációja és a kénglobulusok keletkezése	19
Az elemi kén oxidációja	21
A szulfit oxidációja	23
A mikrobiális kénredukció enzimrendszerei	24
MODELLORGANIZMUSUNK A <i>THIOCAPSA ROSEOPERSICINA</i> BBS	26
<i>THIOCAPSA ROSEOPERSICINA</i> BBS HIDROGENÁZAI ÉS AZOK ANYAGCSERE KAPCSOLATAI	27
A Hup hidrogenáz	27
A Hyn hidrogenáz és anyagcsere kapcsolatai	28
A Hox1 hidrogenáz és anyagcsere kapcsolatai	29
A Hox2 hidrogenáz	30

CÉLKITŰZÉSEK	31
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	32
FELHASZNÁLT BAKTÉRIUM TÖRZSEK	32
FELHASZNÁLT INDÍTÓSZEKVENCIÁK	33
FELHASZNÁLT PLAZMIDOK	34
NÖVESZTÉSI KÖRÜLMÉNYEK	35
<i>ESCHERICHIA COLI</i> NÖVESZTÉSI KÖRÜLMÉNYEK	35
<i>THIOCAPSA ROSEOPERSICINA</i> NÖVESZTÉSI KÖRÜLMÉNYEK	35
Használt oldatok	35
<i>ESCHERICHIA COLI</i> KÉMIAI KOMPETENS SEJT KÉSZÍTÉSE	35
DNS MANIPULÁCIÓS TECHNIKÁK	36
Genomi DNS izolálás <i>Thiocapsa roseopersicina</i> -ból	36
Plazmid DNS tisztítás <i>Escherichia coli</i> -ból	36
Agaróz gélelektroforézis	36
Fragment izolálás	36
PCR reakció	37
Restrikciós emésztés	37
PCR termék foszforilálása	37
Emésztett vektor defoszforilálása	37
Ligálás	38
TRANSZFORMÁLÁS	38
KONJUGÁLÁS	38
MUTAGENEZIS ÉS KOMPLEMENTÁCIÓS TECHNIKÁK	39
AZ <i>ISP2</i> GÉN MUTAGENEZISE	39
AZ <i>ISP2</i> DELÉCIÓJÁNAK HOMOLÓG KOMPLEMENTÁCIÓJA	39
MÉRÉSI MÓDSZEREK	40
<i>IN VIVO</i> HIDROGÉNTERMELÉS ÉS FELVÉTEL MÉRÉSE	40
<i>IN VIVO</i> KÉNHIDROGÉN TERMELÉS MÉRÉSE	41
SZULFÁT MENNYISÉG MEGHATÁROZÁSA	41
HYN HIDROGENÁZ MENNYISÉGÉNEK MEGHATÁROZÁSÁHOZ SZÜKSÉGES TECHNIKÁK	41
Sejtfeltárás szonikálással	41
Fehérje mennyiségi mérése Lowry módszerrel	41
Western blot	42
KÉNANYAGCSERÉBEN SZEREPELT JÁTSZÓ GÉNEK KERESÉSE ÉS ANNOTÁLÁSA A GENOMI SZEKVENCIA ALAPJÁN	43

EREDMÉNYEK	44
A HYN HIDROGENÁZ ANYAGCSERE KAPCSOLATAI	44
A HYN HIDROGENÁZ HIDROGÉNTERMELÉSÉNEK NÁTRIUM-TIOSZULFÁT FÜGGÉSE	44
<i>THIOCAPSA ROSEOPERSICINA</i> KÉNANYAGCSERE MODELJÉNEK FELÁLLÍTÁSA ÉS A LEGFONTOSABB OPERONOK BIOINFORMATIKAI ANALÍZISE	45
A HYN HIDROGENÁZ HIDROGÉNTERMELÉSÉNEK ELEKTRONDONORAI	47
KAPCSOLAT A HYN HIDROGENÁZ ÉS A KÉNHIDROGÉN TERMELÉS KÖZÖTT	52
KAPCSOLAT A MEMBRÁN ELEKTRONTRANSPORT LÁNC ÉS A HYN HIDROGENÁZ KÖZÖTT	55
Az Isp2 SZEREPE A HYN HIDROGENÁZ ELEKTRONTRANSPORTJÁBAN	55
A FOTOSZINTETIKUS ELEKTRONTRANSPORT SZEREPE A HYN HIDROGENÁZ HIDROGÉNTERMELÉSÉBEN	56
A HYN HIDROGENÁZ TERMINÁLIS ELEKTRONAKCEPTORAI	60
A Hox1 HIDROGENÁZ KAPCSOLATAI A KÉNANYAGCSERÉVEL	61
EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE	64
ÖSSZEFOGLALÁS	69
SUMMARY	72
HIVATKOZÁSOK JEGYZÉKE	75
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	81
SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE	82
KÖZLEMÉNYEK MELYEK A DOLGOZAT ALAPJÁT KÉPEZTÉK	82
KÖZLEMÉNYEK MELYEK NEM KÉPEZTÉK A DOLGOZAT ALAPJÁT	82
EGYÉB KÖZLEMÉNYEK - KONFERENCIA ELŐADÁSOK - POSZTEREK	83

Motto

"Test ideas by experiment and observation, build on those ideas that pass the test, reject the ones that fail. Follow the evidence wherever it leads, and question... everything. Accept these terms, and the cosmos is yours..."

- Neil deGrasse Tyson

Rövidítések jegyzéke

Å: Ångström

AMP: adenzin monofoszfát

Amp: Ampicillin

Apr: Adenzin-foszfoszulfát reduktáz

APS: adenzin-foszfoszulfát

ATP: adenzin trifoszfát

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool / Egyszerű Helyspecifikus Illesztési Kereső Algoritmus
Szekvencia adatokban való keresésére

bp: bázispár

CCCP: Carbonil-cianid-3-klorofenilhidrazon

CN: ciano ligandum

CO: szénmonoxid ligandum

Cys: Cisztein

Cyt bc1: Citokróom bc1

Cyt b6f: Citokróom b6f

C₂ : citokróom C₂

DMN: : 2,3-dimethyl-1,4-naphthoquinone / 2,3-dimetil-1,4-naftokinon

DMSO: dimetil- szulfoxid

DNS: dezoxiribonukleinsav

dNTP: dezoxinukleozid-trifoszfát

Dsr: Disszimilációstípusú szulfit reduktáz

Ech: Energy conserving hydrogenase / Energia átalakító hidrogenáz

EDTA: Etiléndiamin-tetraecetsav

Er: Eritromicin

Fcc: Flavocitokróom C

Fdx: Ferredoxin

FeS: Vas-kén kocka

FNR: Ferredoxin NADH oxidoreduktáz

F₄₂₀: Coenzyme F₄₂₀ / Koenzim F₄₂₀

Gm: Gentamicin

HiPiP: High Potential iron-sulfur Protein / Fotoszintetikus reakciócentrumba donáló magas redoxpotenciálú vas kén kockát tartalmazó fehérje

Hmc: High molecular weight cytochrome / Nagy molekulatömegű citokróm

H₂ase: Hidrogenáz

kDa: kilodalton

Km: Kanamicin

LB: Luria Broth /Luria tápoldat

LH: Light Harvesting complex / Fénybegyűjtő komplex

MoCO: Molibdopterin tartalmú aktív centrum

NAD(H): Nikotinamid-adenin-dinukleotid (redukált forma)

NADP (H): Nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát (redukált forma)

N₂ase : Nitrogenáz

ORF: Open Reading Frame / Nyitott leolvasási keret

PC: Photoautotrophic Conditions / Pfennig féle fotoautotróf tápoldat

PCR: Polymerase Chain Reaction / Polimeráz láncreakció

pmf: proton motive force / proton motoros erő

PQ: plasztokinon

PSI: Photosystem one / egyes fotokémiai rendszer

PSII: Photosystem two / kettes fotokémiai rendszer

P870: bakterioklorofil pár a bíorbaktériumok fotoszintetikus reakciócentrumának akceptor oldalán.

Q_a: elsődleges kinonkötő hely a fotoszintetikus reakciócentrumban

Q_b: másodlagos kinonkötő hely a fotoszintetikus reakciócentrumban

Q (H₂): Kinon (redukált forma)

Qmo: Transzmembrán elektrontranszport és kinon redukáló komplex

RC: Reaction Center / Fotoszintetikus reakció centrum

RNS: ribonukleinsav

rpm: rotation per minute /percenkénti fordulatszám

R-SH: kéntrapszporter molekula perszulfid formája

R-SS⁻: kéntrapszporter molekula perdiszulfid formája

R-SS-R: kéntrapszporter molekula diszulfid formája

Sat: Szulfát-adenil-transzferáz

SDS: nátrium-dodecil-szulfát

SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis /Denaturáló

poliakrilamid gélelektroforézis

Sat: Szulfát adenilil transzferáz

SoeABC: Szulfit oxidáló enzim

Sgp: Sulfur globule protein / Kénglobulus fehérje

SOB: Super Optimal Broth / Szuper optimális tápoldat

Sor: Szulfit oxidoreduktáz

Sox: Tioszulfát oxidáló multienzim komplex

Sqr1: Szulfid függő kinon reduktáz 1

Sqr2: Szulfid függő kinon reduktáz 2

SR: Kénreduktáz

Str: Streptomycin

TAE: 0,004 M Tris-acetát, 0,001 M EDTA puffer

TBST: 50 mM Tris; 150 mM NaCl; 0.05% Tween 20 pH= 7.6

T4 PNK: T4 polinukleotid kináz

Bevezetés

A világ energiaellátása

Napjaink egyik legfontosabb megoldásra váró feladata az emberiség egyre növekedő energiaigényének kielégítése, azonban a konvencionális fosszilis energiahordozók egyre nehezebben elérhetők. A nem-konvencionális fosszilis energiahordozók térnyerésével az energiaigény kielégítése megoldható, de környezetvédelmi szempontból továbbra is nagyon fontos kérdés, hogy megújuló vagy fosszilis energiahordozók felhasználásával fedezzük-e energiaigényünket.

Az elmúlt években a drasztikusan javult például az olajhomok és olajpala kitermelési és feldolgozási hatékonysága, és Észak-Amerikában már a kitermelés is megkezdődött. Mivel a jövőben további javulás várható ezen a téren, így már árban és elérhetőségben ezek az energiahordozók is versenyképesek lehetnek a hagyományos kőolaj kitermeléssel szemben (Brandt és mtsai, 2013). A világ legnagyobb olajhomok készletei a fejlett országokban vannak, ahol a legnagyobb a fosszilis energiahordozó felhasználás, és nagyobb hangsúlyt fektetnek az ellátási biztonságra, ez pedig fontos oka lehet a nem konvencionális energiahordozók szélesebb körű felhasználásának. Az olajhomok a nem konvencionális energiahordozók közül csak egy kiragadott példa, számítások szerint a gázpala kitermelése még az olajhomok kitermelésénél is gazdaságosabb lehet a közeljövőben. Az emberiség energiaellátása tehát megoldható. Azonban a nem-konvencionális energiahordozók bányászata és feldolgozása nagy környezetterheléssel jár; ezért jelenleg sokkal inkább környezetvédelmi kérdés, hogy milyen forrásból fedezzük a világ energiaigényét (Chu és mtsai, 2012).

A megújuló energiaforrások és energiahordozók felhasználásában rejlő lehetőségek és nehézségek

Ahhoz, hogy a környezetszennyező fosszilis energiahordozókat (legyen akár szó konvencionális, vagy nem konvencionális fosszilis energiahordozókról) felváltsuk, alternatívákat kell találnunk. Ilyen alternatíva lehet az atomenergia. Azonban az uránérc nem megújuló energiahordozó, továbbá Európa egyes részein tapasztalható természettudományosan nem indokolt ellenérzések miatt további térnyerése kérdéses.

Az alternatívák közül a klasszikus megújuló energiaforrások kiaknázása lehet az egyik megoldás. Ilyen energiaforrás lehet a szél-, a nap- és a vízenergia. A vízenergia felhasználási részaránya a világon keveset változott az elmúlt évtizedekben, mert felhasználási hatékonysága elsősorban geográfiai tényezők függvénye (Panwar és mtsai, 2011). A nap és a szélenergia felhasználása az egyik legígéretesebb lehetőség. A fotoelektromos rendszerek közvetlenül elektromos áramot állítanak elő, de a felhasznált ritkaföldfémek árának várható növekedése, illetve a bányászatukkal járó környezetterhelés miatt ez a megoldás nem optimális. Továbbá a mérsékelt égövben nagy változékonyságot mutat a napsütéses órák száma és eloszlása, amely egy dominánsan fotoelektromos eredetű áramtermelés esetén ellátási ingadozást eredményezhet. A szélenergia felhasználásánál is a fluktuáció okoz problémát. Az elektromos áramfogyasztásunk is drasztikus ingadozást mutat napi, heti és éves szinten egyaránt. Ez a jelenség a szél és a napenergia fluktuációjával együtt adja az alternatív energiahordozók igazi Achilles-sarkát. Az ingadozás kiküszöbölhető egy kontinentális energiaelosztó hálózattal, vagy gyorskapcsolású komplementer erőművek telepítésével, de ezek a beruházások az energiaellátás költségeit drasztikusan megnövelik (Xydis, 2013).

Az emberiségnek a stabil energiaellátás érdekében egy olyan energiahordozóra van szüksége, ami bárhol előállítható, tárolása és szállítása megoldható, és elégetése során káros melléktermék nem keletkezik. Az előállíthatóság és a tárolhatóság problémájára megoldást nyújthat a biomassa alkalmazása, de jól felhasználható energiahordozóvá alakításához finomítási eljárások szükségesek. A beruházási költségek, fermentáció/finomítás hatékonysága és a szubsztrát szállítási költségei miatt, a biomassa alapú energiahordozók költséghatékonyságban még nem versenyképesek a konvencionális energiahordozókkal szemben (Panwar és mtsai, 2011). Bár állami szubvenciókkal az alternatív üzemanyagok már bekerültek a gazdaság vérkeringésébe, ez pedig azt is mutatja, hogy szűkül a gazdasági rés a hagyományos és alternatív energiahordozók között.

A hidrogén, mint megújuló energiahordozó

Hosszú távon a magfúzió láthatja majd el energiával az emberiséget, de addig is, míg annak a technológiáját kidolgozzák, már létezik olyan energiahordozó, mely megoldást nyújthat. Ez nem más, mint a hidrogén. Előnye, hogy elégetése során káros anyag nem keletkezik, nagy az energiasűrűsége, elégetése során közvetlenül lehet belőle akár elektromos áramot, akár hőt előállítani (Pandey és mtsai, 2013).

Hidrogén előállítására több megoldás van. Jelenleg az iparban metán és vízgőz reakciójával állítják elő, amihez sok energiára és fosszilis tüzelőanyagra van szükség. Egy másik módszer az elektrolízis, amely azonban még nem elterjedt, mert a villamos energiát ehhez is fosszilis energiahordozók vagy atomenergia felhasználásával kell előállítani. Az utóbbi években komoly előrelépés történt az elektrolitikus hidrogén előállítás területén. Azzal, hogy félvezető üvegfelületet kettes oxidációs állapotú kobalttal vontak be lényegesen hatékonyabbá és olcsóbbá tették a vízbontást (Kanan és Nocera, 2008). Jelenleg ennek a technológiának az iparba történő bevezetése folyamatban van.

Az Igazán nagy kihívást a hidrogén környezetbarát előállítása jelenti. A kihívás maga az, hogy a hidrogént kis környezetterhelés mellett, versenyképes áron tudjuk előállítani nagy mennyiségben, hogy legalább részben alternatívát kínáljon a fosszilis energiahordozókkal szemben. Elegáns megoldás a víz fotokémiai bontása lehet. A folyamat során olyan szupramolekulát használnak, aminek egy része elnyeli a fényt és vízbontásból származó elektronokat továbbítja, másik része pedig hidrogént termel. A hidrogéntermelő szupramolekula leutánczott fotoszintetikus reakciócentrumból és vas-vas hidrogenázok aktívcentrumából áll. A módszer nagyon ígéretes, de még kísérleti stádiumban van (Sun, Åkermark, és Ott, 2005).

Hidrogént előállíthatunk tisztán biológiai rendszerek segítségével is. Ennek a megoldásnak nagy előnye, hogy a mikroorganizmusok megfelelő körülmények között önreprodukáló, önjavító rendszerek. A különböző mikrobák más-más anyagok és enzimek felhasználásával különféle körülmények között képesek a hidrogéntermelésre (Pandey és mtsai, 2013).

Irodalmi áttekintés

A hidrogéntermelésben szerepet játszó enzimek

Hidrogéntermelésére a hidrogenázok és nitrogenázok egyaránt képesek. A hidrogéntermelés hatékonyságában a két enzimszisztéma vetekszik, azonban a hidrogenázokon lényegesen több hidrogéntermelési stratégia alapul, mert változatos anyagcsere-kapcsolatokkal és enzimológiai jellemzőkkel rendelkeznek. Ezáltal több ponton be lehet avatkozni a működésükbe, hogy a hidrogéntermelést növelni tudjuk.

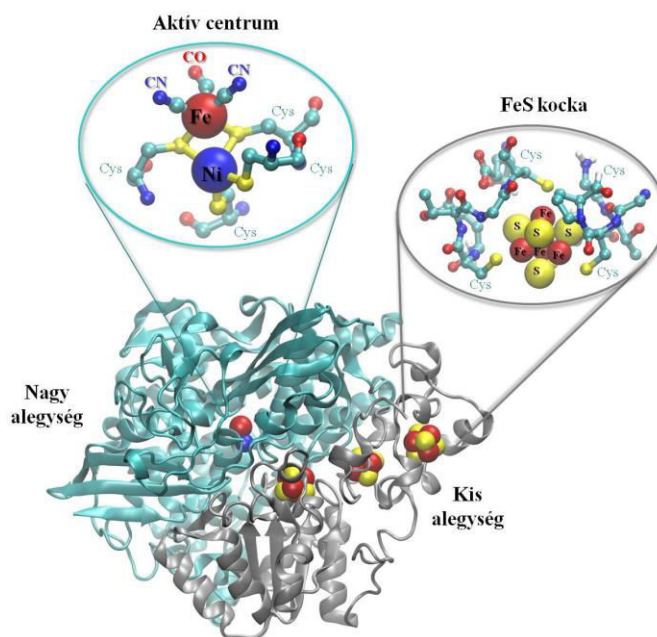
A hidrogenázok csoportosítása és általános jellemzése

A hidrogén anyagcsere kulcsenzime a hidrogenáz, mely a reverzibilis protonredukciót katalizálja: $H_2 \rightleftharpoons 2H^+ + 2e^-$. A reakció iránya a partnerek redoxpotenciáljától függ (Cammack és mtsai, 2002). Ezzel szemben *in vivo* körülmények között a hidrogenázok aktivitása sokkal több paramétertől függ, de a legfontosabb a sejt redoxpotenciálja és a fiziológiai elektrondonorok/akceptorok jelenléte vagy hiánya. A hidrogenázok rendkívül érzékenyek a reakció körülményekre; pH, hőmérséklet, oxigén, szénmonoxid és cianid vegyületek változó mértékben roncsolják az enzimet és csökkentik annak aktivitását (Cammack és mtsai, 2002).

A hidrogenázok csoportosítása történhet aktív centrumuk fémtartalma alapján (Vignais és Billoud, 2007):

- A vas-kén kocka mentes [Fe]-hidrogenázok, amelyek metanogén archeabaktériumokban fordulnak elő.
- A vas-vas [FeFe]-hidrogenázok, amelyek nagyon elterjedt csoportot alkotnak. Ilyen hidrogenázok találhatók a *Clostridium* fajokban és jellemzően az algákban. Az aktív centrumukban két központi fématom van és mindkettőhöz CO és CN ligandumok kapcsolódnak. Hidrogéntermelő aktivitásuk meghaladja a [NiFe]-hidrogenázokét, azonban környezeti hatásokra, elsősorban oxigénre különösen érzékeny enzimek.
- A nikkel-vas [NiFe]-hidrogenázok, amelyek heterodimer szerkezetűek.

A három csoport közül modellorganizmusunkban, a *Thiocapsa roseopersicina* BBS-ben (*T. roseopersicina* BBS), csak [NiFe]-hidrogenázok fordulnak elő, ezért részletesen csak ezek tulajdonságait ismertetem. A kis alegység átlagosan 30 kDa méretű és három - az elektrontranszportban szerepet játszó - vas-kén kockát tartalmaz. A [NiFe]-hidrogenázok nagy alegysége átlagosan 60 kDa méretű és ez tartalmazza a hidrogén bontásáért, illetve szintéziséért felelős katalitikus nikkel-vas heterobinukleáris fémkomplexet. A fématomok koordinálásában nélkülözhetetlen a két konzervált cisztein pár, melyek közül az egyik csak a nikkel atomhoz, míg a másik mind a nikkel, mind a vas atomhoz kapcsolódik. A vas atomhoz még egy CO és két CN-ligandum is kapcsolódik (1. ábra) (Vignais és Billoud, 2007). Az enzim működése során a molekuláris hidrogén hidrofób csatornákon keresztül közlekedik, az elektronok a vas-kén kockákon keresztül jutnak el a redoxpartnerhez. A protonok számára pedig több alternatív csatorna ismert (Dementin és mtsai, 2004; Szőri-Dorogházi és mtsai, 2013).



1. ábra: A [NiFe]-hidrogenázok térszerkezete. A nagy alegység zöld színnel van jelölve, a kis alegység szürkével (Szőri-Dorogházi 2013.)

Mindhárom hidrogenáz csoportra igaz, hogy a fő alegységek változatos számú és szerkezetű kiegészítő alegységekhez kapcsolódhatnak, melyek meghatározzák az adott hidrogenáz fiziológiai kapcsolatait, *in vivo* működési körülményeit.

A [NiFe]-hidrogenázokat a kiegészítő alegységek jelenléte vagy hiánya alapján a következő alcsoportokba sorolhatjuk (Vignais és Billoud, 2007):

1. Légzési lánchoz kapcsolt [NiFe]-hidrogenázok
 - Membránkött, periplazmatikus [NiFe]-hidrogenázok
 - Periplazmatikus, szolúbilis [NiFe]-hidrogenázok a szulfátredukáló baktériumokban
 - Membránkött archaeális hidrogénbontó [NiFe]-hidrogenázok
2. Citoplazmatikus heterodimer [NiFe]-hidrogenázok
 - Cianobakteriális H₂-bontó hidrogenázok
 - Szenzor hidrogenázok
3. Citoplazmatikus, reverzibilis [NiFe]-hidrogenázok
 - Metanogének F₄₂₀-redukáló [NiFe]-hidrogenázai
 - Hipertermofilek reverzibilis [NiFe]-hidrogenázai
 - Metil-viologén redukáló [NiFe]-hidrogenázok
 - NAD⁺-függő [NiFe]-hidrogenázok
4. Energiakonzerváló membrán asszociált hidrogenázok

A legtöbb [NiFe]-hidrogenáz hidrogén felvételi irányban működik. A hidrogén felvételért felelős enzimek fiziológiai jelentősége elsősorban abban rejlik, hogy az adott organizmus a hidrogéntermelő rendszerek által fejlesztett hidrogént tudja hasznosítani általuk (Vignais és Billoud, 2007). A reverzibilis NAD⁺-függő [NiFe]-hidrogenázok és a membránkött, periplazmatikus [NiFe]-hidrogenázok képesek hidrogéntermelésre is. A dolgozat membránkött periplazmatikus [NiFe]-hidrogenázokkal és reverzibilis NAD⁺-redukáló hidrogenázokkal kapcsolatos, ezért ezeket ismertetem részletesebben.

A membránkött hidrogenázok

A membránkött periplazmatikus hidrogenázok a légzési lánchoz kapcsoltan működnek. Azon mikroorganizmusok, melyek tartalmaznak membránkött hidrogenázt, általában képesek

a hidrogént, mint energiaforrást felhasználni. Legtöbb esetben ezen hidrogenázok feladata, hogy a hidrogén oxidálása során nyert elektronokat a membránban található kinon raktárba juttassák. A kinon raktárból az elektronok egy terminális elektronakceptorra kerül, miközben protontranszlokáció történik. A folyamat terminális elektronakceptora lehet a nitrát, a szulfát, a fumarát és az oxigén (Vignais és Billoud, 2007). A membránkötött hidrogenázok csoportjába tartoznak továbbá a szulfátredukáló mikrobák szolúbilis periplazmatikus hidrogenázai, melyek alacsony redoxpotenciálú citokrómokon és a *hmc* operon által kódolt transzmembrán elektronszállító fehérjekomplexen keresztül állnak kapcsolatban a szulfátredukcióval (Morais-Silva és mtsai, 2013).

A reverzibilis [NiFe]-hidrogenázok

A hidrogenázok ezen csoportja figyelemre méltó diverzitást mutat. A *Methanosarcina barkeri* membránkötött Ech hidrogenáza ferredoxin-függő hidrogéntermelést és proton transzlokációt katalizál, míg a *Methanosarcina mazei* F₄₂₀ koenzim-függő hidrogenáza a redukált F₄₂₀ felhasználásával termel hidrogént és épít fel protongrádienszt a membrán két oldala között (Vignais és Billoud, 2007). A legjobban jellemzett alcsoport a szolúbilis hidrogenázok közé tartozó NAD(P)⁺-redukáló hidrogenázok. Enzimológiaiailag először a fakultatív kemolitotróf *Ralstonia eutropha* (*R. eutropha*) NAD(P)(H)-függő hidrogenázát jellemezték. Ez az enzim fiziológiás körülmények között elsősorban hidrogén felvételi irányban működik, de képes hidrogéntermelésre is (Burgdorf és mtsai, 2005). Mint a legtöbb hozzá hasonló hidrogenáz két funkcionálisan elkülöníthető részből áll. A központi alegységen (HoxYH) kívül található benne egy diaforáz alegység (HoxFU), amely hasonlóságot mutat a membránban található NADH:kinon-oxidoreduktáz komplexszel. *R. eutropha* esetén, a HoxI alegység is része az enzimnek, amely a NADPH-szubsztrátspecifitásért felel (Burgdorf és mtsai, 2005). Hasonló enzimeket írtak le metanotróf baktériumokban, több cianobaktériumban, köztük *Synechocystis* fajokban és *Gloeocapsa alpicola*-ban is. Ezekben már nincs HoxI alegység, helyette egy HoxE alegység része a komplexnek (Troshina és mtsai, 2002).

A biohidrogén termelés lehetséges módjai

Az egyik lehetséges megközelítés, hogy biomasszából sötét fermentációval állítunk elő biohidrogént. Ekkor is a napfény energiáját hasznosítjuk (Kovács és mtsai, 2005) a biomassza képzéshez és csak a második sötét fermentációs lépésben keletkezik hidrogén. Előnye, hogy nagy hidrogén koncentráció érhető el, azonban hátránya, hogy egy indirekt kétlépéses technológia (biomassza előállítás, fermentáció), így a rendszer összhatékonysága alacsony. A sötét fermentációhoz különböző mikrobákat, például *Enterobacter* és *Clostridium* nemzetségbe tartozó mikroorganizmusokat használhatunk (Hallenbeck és Ghosh, 2012).

A fotofermentáció során azonban közvetlenül is tudjuk a napfény energiáját hidrogéntermelésre fordítani. A fotoszintetizáló bíbor baktériumokban a nitrogénázok nitrogénfixáló körülmények között melléktermékként hidrogént állítanak elő (Benemann, 1996). Hátránya a rendszernek, hogy nagyon sok energia fogy a reakció során és nehezen fenntartható valós körülmények között, mert alternatív nitrogénforrások (pl. ammónia) a legtöbb esetben már kis koncentrációban is gátolják a nitrogénázt. Korlátai ellenére a sötét fermentáció mellett ez a megközelítés áll legközelebb az ipari megvalósításhoz (Keskin és Hallenbeck, 2012).

Jelenleg az algákkal történő fotobiohidrogén termelést kutatják legintenzívebben. Az algák esetében a vízbontásból származó elektronok a fotokémiai rendszereken keresztül jutnak a hidrogenáz enzimekre. A vízbontás során melléktermékként keletkező oxigén azonban gátolja a hidrogenázok működését és expresszióját (Melis és Happe, 2001). A rendszer másik hátránya, hogy a hidrogéntermeléshez az algákat acetát tartalmú táptalajon kell nevelni, a szerves forrás biztosítása azonban költséges. (Melis és Happe, 2001).

Szintén a napfény energiájának hasznosítására kínálnak alternatívát a fototróf bíbor kénbaktériumok. Ezen organizmusok nem a vízbontásból pótolják a fotoszintetikus rendszerbe jutó elektronjaikat, hanem kénvegyületek oxidációjából. Ennek a folyamatnak nagy előnye, hogy nem keletkezik oxigén, mely gátolná a hidrogéntermelést, továbbá a bíbor kénbaktériumok hidrogén-karbonáton/széndioxidon, mint kizárólagos szénforráson képesek növekedni (Sander és Dahl, 2009). A bíbor kénbaktériumok hidrogéntermeléshez szerves szubsztrátot nem igényelnek, a folyamatot hidrogenázokkal vagy nitrogénázokkal katalizálják (Nyilasi és mtsai,

2013). Ezen elméleti megfontolások alapján érdemes a bíbor kénbaktériumok hidrogéntermelését vizsgálni.

A fototróf bíbor baktériumok

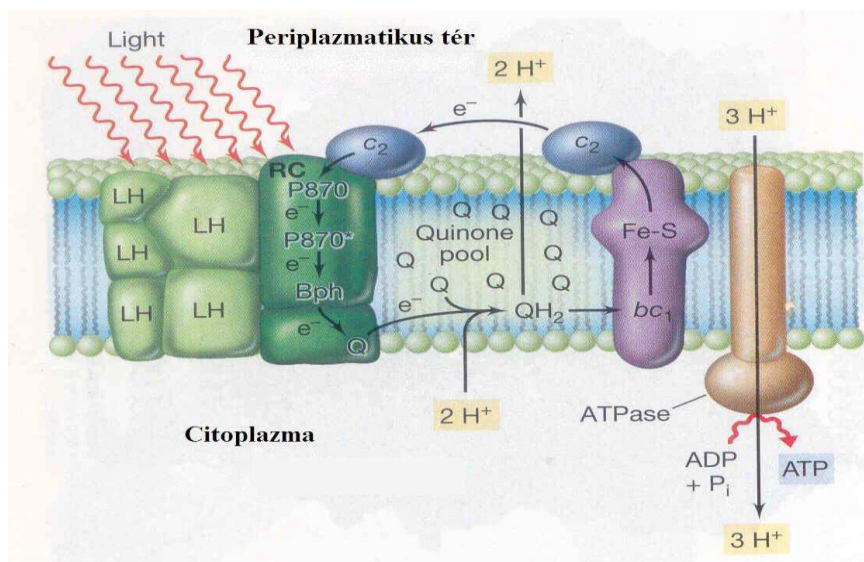
A fototróf bíbor baktériumok nagyon elterjedtek és nagy ökológiai jelentőséggel bírnak. Két fő csoportra osztjuk őket, a bíbor nem-kén és a bíbor kénbaktériumok csoportjára. A fototróf bíbor baktériumok közös tulajdonsága, hogy fotoszintetikus aktivitásuk során oxigén nem termelődik, mivel a strukturálisan kettes-jellegű fotoszintetikus rendszerükből hiányzik a vízbontó komplex, így elektronigényüket más redukált komponensek oxidálásából nyerik (Sander és Dahl, 2009).

Elterjedésük vízi élőhelyeken figyelhető meg, jellemzően olyan környezetben ahol kevés az oxigén és néhány mM-os koncentrációban szulfid található. Ilyen élőhelyek lehetnek a magashegyi tavak alsó – középső rétege, ahol oxigén már alig található és a szerves anyagok mennyisége is limitált, de még a fény egy része lejut ebbe a mélységbe is (Hunter, 2008). Jellemző rájuk, hogy növekedésük egy viszonylag szűk zónára korlátozódik az adott víztestben. Fontos különbség a bíbor kén- és nem-kénbaktériumok között, hogy a kénbaktériumok szulfid toleranciája és felhasználási képessége jobb a bíbor nem-kénbaktériumokhoz képest. Továbbá, a bíbor nem-kénbaktériumok sok esetben fotoheterotróf anyagcserét folytatnak, a kénbaktériumokra elsősorban a fotoautotróf, fotomixotróf növekedés a jellemző. További különbség köztük, hogy a kénbaktériumok intracelluláris kénraktárokat építenek (kivétel *Ectothiorodospirillaceae* család), míg a korlátozott kénhidrogén toleranciával rendelkező nem-kénbaktériumok extracelluláris formában raktározzák a ként (Hunter, 2008). A dolgozatban a *T. roseopersicina* BBS törzset vizsgáltam, ezért az alábbi fejezetekben erre a törzsre az általános ismertetőket mellett külön is kitérek

Fotoszintetikus energiakonverzió bíbor kénbaktériumokban

A bíbor kénbaktériumok nagyon fontos közös tulajdonsága, hogy ciklikus elektrontranszporttal rendelkeznek (2. ábra). A megvilágítás hatására a P870 gerjesztődik, töltésszétválasztás következik be, kilép egy elektron, majd a periplazmatikus citokrómokról egy elektron a fotoszintetikus reakciócentrum akceptor oldalára kerül. A megvilágítás hatására a

P870-ről kilépett elektron a Q_a helyen kovalensen kötött kinonra kerül, majd egy vas atom közvetítésével a Q_b helyen reverzibilisen kötött kinonra továbbítódik. A kinon két elektront vesz fel, majd disszociál a Q_b helyről és már redukált formában a membránban található kinon raktárba kerül. Innen az elektron legalább három úton mehet tovább. A redukált kinon bekötődhet a citokróm bc1 komplexre és szemikinin állapoton keresztül a komplex segítségével leadhatja az elektronokat a periplazmatikus citokrómoknak (c_2) (Hunter és mtsai 2009), miközben protontranszlokáció történik. A redukált citokrómok az elektront a fotoszintetikus reakciócentrumba juttatják vissza. Ezt a körfolyamatot ciklikus elektrontranszportnak nevezzük (Madigan és Martinko, 2006) (2. ábra).



2. ábra: A bíorbaktériumok ciklikus elektrontranszportjának vázlata (Madigan és Martinko, 2006)

A másik út a fotoszintetikus NAD^+ -redukció. Mivel a NAD^+ -redukció középponti redoxpotenciálja -310mV és a kinonok redoxpotenciálja típustól függően 0 és -110 mV között változik (Schoepp-Cothenet és mtsai, 2009) a kinon függő NAD^+ -redukció a NADH:kinon oxidoreduktáz közreműködésével protonmotoros erő felhasználásával mehet végbe. A NADH központi elektronforrás a széndioxid asszimilációhoz, biomassza képzéséhez. A túl nagy NADH/ NAD^+ arány gátolhatja a metabolikus folyamatokat, ezért a felesleges redukáló erőt egyes szolúbilis hidrogenázok hidrogéntermeléséhez használják fel. Az elektronok a kinon raktárból történő elvezetésének harmadik lehetséges módja a terminális elektronakceptorok redukciója.

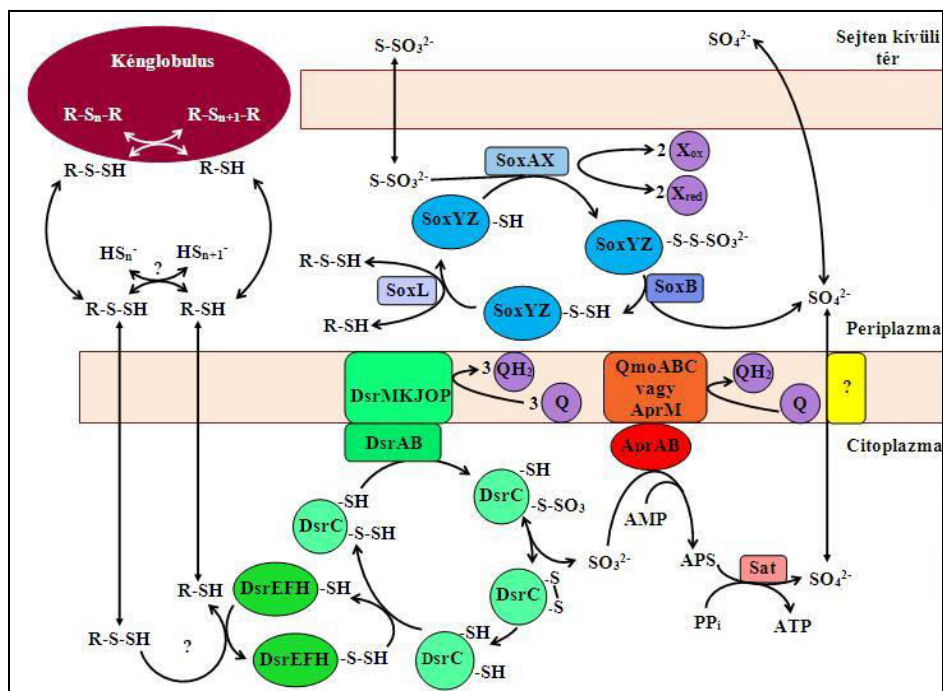
Az ezt végző reduktázok lehetnek bíbor kénbaktériumokban a kénreduktázok, illetve a fototróf bíborbaktériumok legtöbb csoportjában megtalálható nitrátreduktázok is. Bár nitrát reduktázból több típust ismerünk, a Nap típusú az, ami szélesebb körben elterjedt. A kén- és nitrátreduktázok közös jellemzője, hogy a molibdoproteinek családjába tartoznak, és redukált kinonok vagy szolúbilis citokrómok oxidálásából nyerik a működésükhöz szükséges elektronjaikat (Madigan és Martinko, 2006).

Kénanyagcsere bíbor kénbaktériumokban

A szulfid oxidációja, a tioszulfát asszimilációja és a kénglobulusok keletkezése

Bár a membrán elektrontranszport láncban komoly hasonlóság figyelhető meg a bíbor kén- és nem-kénbaktériumok között, más anyagcsere útvonalaikban nagymértékben eltérnek. A bíbor kénbaktériumok, köztük a *T. roseopersicina*, sokféle kénvegyület felhasználására képesek. Ezek közül a legfontosabbak a tioszulfát, a szulfid és az elemi kén. Bíbor kénbaktériumokban a tioszulfát asszimilációját két enzimszisztéma végezheti. Alacsony pH-n a tioszulfát dehidrogenáz enzim (TsdA) katalizálja két tioszulfát-molekula tetratióntá történő kondenzálását. A folyamat során kevés elektron szabadul fel (Denkman és mtsai, 2012). Ebből adódóan jelentősége is szinte elhanyagolható az alapvetően pH=7,0-n növesztett *T. roseopersicina* esetében.

A tioszulfát felhasználásának másik útvonala a Sox enzimszisztéma, amit először *Paracoccus pantotrophus*-ban azonosítottak (Rother és mtsai, 2001), majd a modellt adaptálták *Allochromatium vinosum*-ra is (Hensen és mtsai, 2006). A ciklus azzal kezdődik, hogy a tioszulfát a periplazmatikus térben a SoxYZ heterodimer SoxY fehérjéjének konzervált cisztein aminosavához kötődik. A kötődés során felszabaduló elektronokat a SoxXA fehérjék juttatják a periplazmatikus citokrómokra, amik a fotoszintetikus reakciócentrum akceptor oldalára továbbítják azokat. A tioszulfát asszimiláció fényfüggőségének ez a citokróm függő elektrontranszport az oka. A következő lépésben a SoxB fehérje szulfátként hidrolitikusan lehasítja a terminális szulfátot a kötött tioszulfátról. A visszamaradt perszulfid ezután a kénglobulusba kerül (3. ábra). A SoxY SoxL segítségével történő regenerálását követően a ciklus kezdődhet előlről (Welte és mtsai, 2009).



3. ábra: A tioszulfát asszimilációt végző Sox ciklus helyzete és szerepe *Allochromatium vinosum* kénanyagcsere modelljében (Sander és Dahl, 2009)

Fontos megjegyezni, hogy azon mikroorganizmusok, amelyek rendelkeznek SoxCD komplexszel, nem képeznek kénglobulusokat, mert a tioszulfát mind a két kénjét oxidálják szulfáttá (Zander és mtsai, 2011). Az *Allochromatium vinosum* (*A. vinosum*) és *T. roseopersicina* nem rendelkezik SoxCD komplexszel, így a tioszulfát felhasználása során kénglobulusokat képeznek.

Az elemi kén, mint a kénanyagcsere vízben oldhatatlan köztterméke, nemcsak a tioszulfát asszimiláció során keletkezhet, hanem a szulfid oxidációja során is. Mivel ez az egyik legelterjedtebb kénforma a tengerekben és magas koncentrációban toxikus, több alternatív enzim fejlődött ki átalakítására. A flavocitokróm C egy két alegységes flavoprotein ami a periplazmatikus citokrómokra adja a szulfid oxidációja során felszabaduló elektronokat. A szulfid-függő kinon reduktázok szintén flavoproteinek, amelyek az FCC-vel ellentétben a RC megkerülésével a kinon raktárba juttatnak elektronokat (Sander és Dahl, 2009).

A fent leírt folyamatok mutatnak rá, hogy a *Chromatiaceae* család tagjaiban a legtöbb külső forrásból származó kénvegyület asszimilációja elemi kénen keresztül történik. *A. vinosum*-ban és *T. roseopersicina*-ban ezeket a globulusokat az SgpABC (Prange és mts., 2004) fehérjék határolják. Ezen fehérjék a sejt fehérjetartalmának kitehetik akár a 3,5 %-át is. Az SgpAB dupla mutáns *Allochromatium vinosum* törzs nem életképes, az SgpC fehérje hiányában a kénglobulusok mérete csökken, a kénvegyületek felhasználásának kinetikai változása nélkül. Valószínűsíthető tehát, hogy az Sgp fehérjék szerkezeti szerepet töltenek be (Prange és mtsai, 2004).

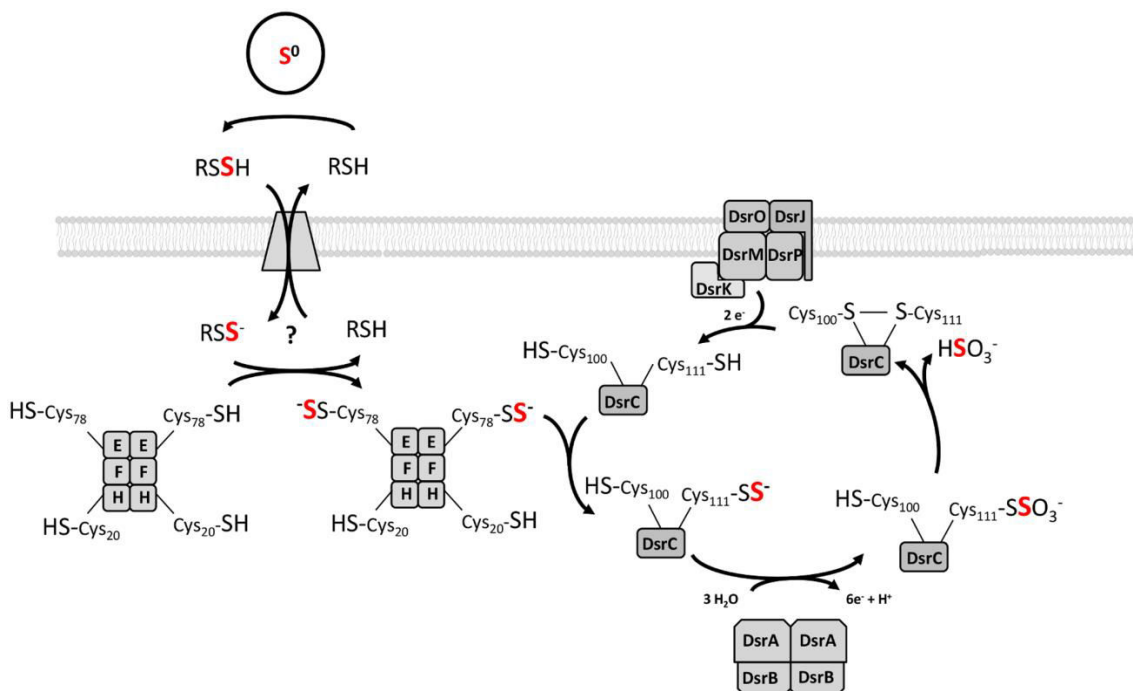
Az elemi kén oxidációja

A bíbor kénbaktériumok képesek az elemi kén oxidálására is. Az elemi kén lehet külsőleg hozzáadott oldhatatlan elemi kén is, amihez a sejtek hozzákapcsolódnak, és egy eddig ismeretlen mechanizmuson keresztül felveszik, majd oxidálják az oldhatatlan elemi ként. A kén másik forrása lehet a periplazmatikusan, kénglobulusokban tárolt kén. Ezek a kénglobulusok poliszulfidokat, organikus poliszulfidokat és gyűrűs elemi ként is tartalmaznak. Az elemi kén oxidálásához a ként a citoplazmába kell szállítani (Franz és mtsai, 2007). A mobilizációban a rodanáz enzim vesz részt (Stockdreher és mtsai, 2014), majd a kötött kén egy transzporter molekula segítségével bejut a citoplazmába. Erre a szerepre az egyik jelölt a glutation-amid, amelynek már a redukált és perszulfid formáját is azonosították *Allochromatium vinosum*-ban (Bartsch és mtsai, 1996). A transzporter molekuláról a kén a TusA enzim segítségével kerül a kénoxidáló rendszerbe (Stockdreher és mtsai, 2014).

Az elemi kén szulfittá történő oxidációját a citoplazmatikus lokalizációjú disszimilatív típusú szulfit reduktáz (Dsr) katalizálja. A kénoxidáló mikrobákban - köztük *T. roseopersicina* esetén is (Dahl és mtsai, 1999) - a Dsr enzimrendszert a *dsrABEFHCMKLJOPNRS* operon kódolja. Katalitikus alegységei a *dsrA* és *dsrB* gén által kódolt fehérjék (Pott és Dahl, 1998; Dahl és mtsai, 2005). A Dsr rendszer alkomploksekre tagolható: DsrAB fehérjével kölcsönhat a DsrC fehérje, a DsrEFH komplex és a DsrMKJOP komplex egyaránt (Dahl és mtsai, 2005). A *dsrR* és *dsrS* gének nem feltétlenül egy operonban találhatóak a többi *dsr* génnel, és nem szükségszerűen vannak jelen minden kénoxidáló baktériumban. *A. vinosum*-ban kimutatták, hogy mind a DsrR-nek,

mind a DsrS-nek a Dsr operon poszttranszkripció szabályozásában van szerepe (Grimm és mtsai, 2010); hiányukban 50%-al csökken a kénoxidációs ráta (Grimm és mtsai, 2011).

A Dsr enzimszisztéma működését, azaz a kénoxidációt minden lépésében nem sikerült még feltárni, de a reakció modelljét az 4. ábra szemlélteti.



4. ábra: A Dsr enzimszisztéma működési modellje (Stockdreher és mtsai, 2012)

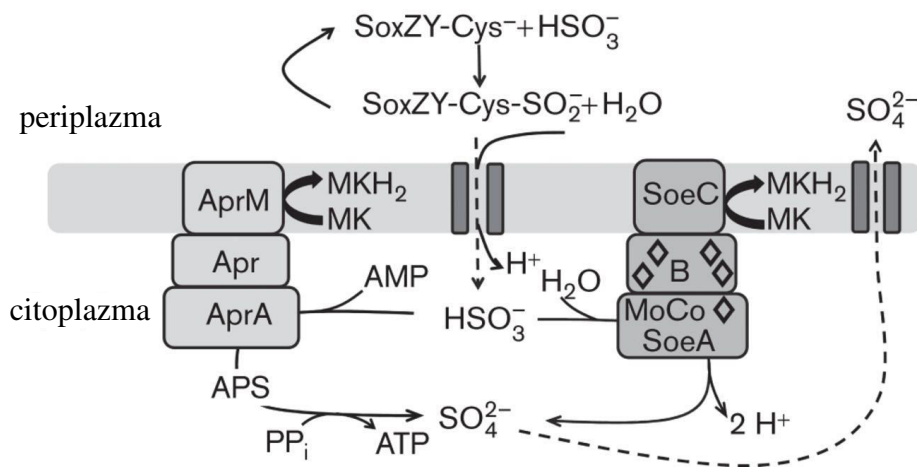
A DsrMKJOP egy transzmembrán komplex, melyben az alegységek jóslott szerkezete alapján a komplex vélhetően transzmembrán elektrontranszport feladatot tölt be mindkét mikroorganizmus esetében. A DsrK egy citoplazmatikus fehérje, amely hasonlóságot mutat a Hyn hidrogenáz Isp2 alegységével (Rakhely és mtsai, 1998), illetve az egyes metanogénekben megtalálható heterodiszulfid-reduktáz D alegységgel (Dahl és mtsai, 1999). A heterodiszulfid-reduktázokhoz való hasonlósága alapján feltételezik, hogy a DsrK lehet az a fehérje, amely a DsrC 100-as és 111-es konzervált ciszteinje között kialakuló diszulfid hidat bontani képes, de erre közvetlen kísérleti bizonyíték nincs (Cort és mtsai, 2008). A DsrMKJOP komplexnek az a szerepe, hogy a kénoxidáció során keletkező elektronokat a fotoszintetikus reakciócentrumba juttassa. A komplexből a periplazmatikus trihem citokróm C-khez hasonló DsrJ adja tovább az

elektronokat a RC HiPiP-alegységére, hiányában *A. vinosum*-ban leáll a kénoxidáció (Sander és mtsai, 2006; Grein és mtsai, 2010).

A szulfit oxidációja

A szulfit a kénoxidáció toxikus közti terméke, amelyképes elreagálni a fehérjék hozzáférhető ciszteineiben található perszulfidokkal. Ha a sejten kívül halmozódik fel, akkor a szulfiddal és elemi kénnel elreagálva tioszulfátot képez. A szulfit a tioszulfát dehidrogenázt is képes gátolni (Hensen és mtsai, 2006). *A. vinosum* legalább kétféle módon képes a szulfitot szulfáttá oxidálni. A citoplazmában lejátszódó oxidáció során először az adenilil-szulfát-reduktáz AMP felhasználásával adenzin-foszfoszulfátot (APS) képez, miközben 2 elektron szabadul fel. Ezen elektronok akceptora nem ismert, de a legvalószínűbb modell szerint azok a kinon raktárba kerülnek (Sánchez és mtsai, 2001). Az oxidáció további lépései során az APS AMP csoportja reagálhat pirofoszfáttal és foszfáttal egyaránt. Az előbbi reakciót az ATP-szulfuriláz katalizálja és a szulfát mellett ATP keletkezik. Utóbbi reakciót az adenililszulfát-foszfát-adenilil-transzferáz enzim katalizálja és a szulfát mellett ADP keletkezik. Ennek az útvonalnak a hiányában a sejt még képes a szulfit oxidációjára (4. és 5. ábra) (Kappler és Dahl, 2001).

A szulfit egylépéses, direkt oxidációja elterjedtebbnek tűnik a 2 lépéses oxidációhoz képest (Sánchez és mtsai, 2001; Kappler és Dahl, 2001). A direkt útvonal kulcsenzime a SoeABC komplex, ami a molibdoproteinek családjába tartozik (5. ábra) (Dahl és mtsai 2013). Ez egy három alegységes oxidoreduktáz, amely rendelkezik egy kinonok redukcióját végző membránkötött alegységgel, egy vas-kén kockákat tartalmazó elektrontranszport alegységgel, valamint egy vas-molibdén tartalmú katalitikus alegységgel. Ez a felépítés megfelel a legtöbb molibdoprotein általános felépítésének (Dahl és mtsai, 2013).



5. ábra: A szulfid oxidációja *Allochromatium vinosum*-ban (Dahl és mtsai 2013)

A szulfid oxidációjának van másik fontos szereplője a SoxY. Azt találták, hogy SoxY hiányában szintén csökken a szulfid oxidációja. Ez annak tulajdonítható, hogy a SoxY megköti a kívülről adott szulfidot és azt a SoeABC számára felhasználhatóvá teszi (5. Ábra) (Dahl és mtsai 2013).

A mikrobiális kénredukció enzimszerei

A kén nem csak oxidálni, hanem redukálni is lehet. Abban az esetben, ha a membrán redox rendszer túlredukált, szükséges lehet az elektronok elvezetésére. Más körülmények között viszont szüksége lehet a sejtnak egy olyan elektronakceptorra, melynek redukciója során protongradiens képzés és ezen keresztül ATP szintézise történik. Ezen feladatok potenciális megoldása lehet az elemi kén redukciója (Dietrich és Klimmek, 2002).

A kénreduktázok egyik típusa a molibdoproteinek közé tartozó membránköthött kénreduktázok. Ezek leginkább három alegységes enzimek: rendelkeznek egy membránköthött kinon oxidáz alegységgel, egy vas-kén kockákat tartalmazó elektrontranszport alegységgel és egy molibdopterin aktív centrumot tartalmazó katalitikus alegységgel. Mivel a redukált kinonok oxidációját végzik, működésük során protontranszlokáció mehet végbe. A legjobban jellemzett membránköthött kénreduktázok az *Acidianus ambivalens* (Laska és mtsai, 2003) *Aquiflex aeolicus* (Guiral és mtsai, 2005) és *Wolinella succinogenes* kénreduktázai (Dietrich és Klimmek, 2002). Azon kívül, hogy ezek a kénreduktázok a molibdoproteinek családjába tartoznak, közös tulajdonságuk, hogy működésük hidrogén felvétellel kapcsolt. Az *A. ambivalens* és *A. aeolicus*

esetén egy Hyn típusú hidrogenáz része a kénreduktáz szuperkomplexnek. Az *A. aeolicus* esetén azonban ugyanebben a respiroszómában található a Hup típusú hidrogenáz-citokróm bc₁ komplex is, így nem lehet egyértelműen megmondani, mely hidrogenáz az elektrondonora a kénhidrogén termelésnek. Ezzel szemben a *W. succinogenes* esetében Hup típusú hidrogenáz által felvett elektronok redukálhatják a ként. Felmerülhet az a kérdés, hogy milyen elemei vannak az elektrontranszport láncnak. Mind a három példaként említett rendszerben redukált kinonok szolgálnak elektron mediátorként a kénredukcióhoz. A vizsgált esetekben a menakinon különböző származékai bizonyultak a kénredukcióban elsősorban szerepet játszó kinonnak. Ez egybevág azzal, hogy *Salmonella enterica* esetében szintén egy menakinon származék volt a molibdoproteinek családjába tartozó tioszulfát reduktáz elektrondonora (Stoffels és mtsai, 2012). Bioenergetikailag pedig ennek a koherenciának nem más az oka, mint hogy a középponti potenciálja a menakinonoknak a legkisebb a kinonok közül (-75 és -112 mV között) (Dietrich és mtsai, 2002; Schoepp-Cothenet és mtsai, 2009), így ennek a kinonnak a redoxpotenciálja áll legközelebb a kénredukció -270 mV-os redoxpotenciáljához (Madigan és Martinko, 2006). Ilyen redoxpotenciál különbség mellett a kinon függő kénredukció nagy redukált/oxidált kinon arány mellett mehet végbe, vagy energiát/protonmotoros erőt igényel a reakció. Korábbi tanulmány szerint *W. succinogenes*-ben protonofor jelenlétében csökken a kénhidrogén termelés, illetve membrán frakcióban kisebb a kénredukció sebessége, mint egész sejtben (Dietrich és Klimek, 2002).

Modellorganizmusunk a *Thiocapsa roseopersicina* BBS



6. ábra: Modellorganizmusunk a *T. roseopersicina* szérum üvegekben és mikrocentrifuga csövekben.

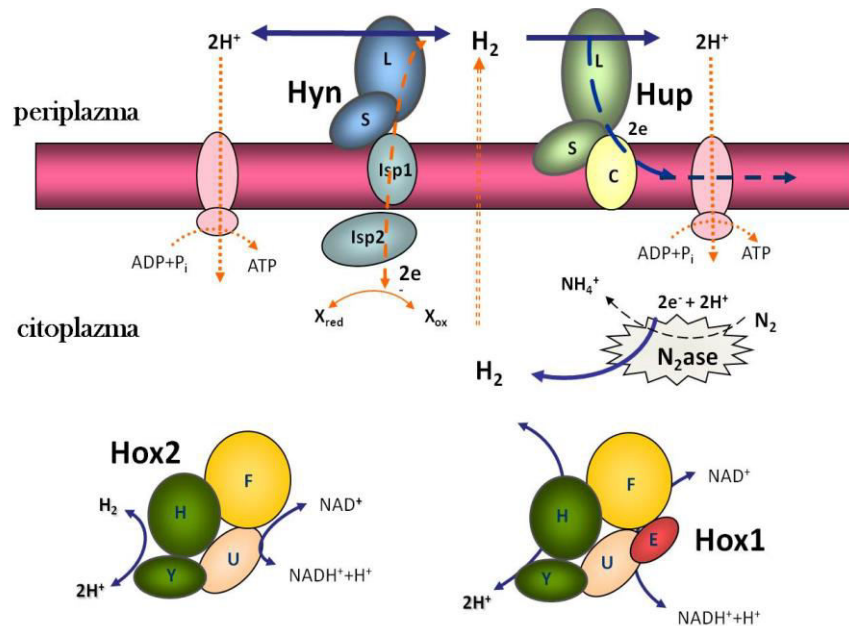
A *T. roseopersicina* BBS egy bíbor kénbaktérium, amely a *Chromatiaceae* családba tartozik (Bogorov, 1974). Eredetileg az Északi-tenger 14 °C-os vizéből izolálták. Mivel a baktérium természetes élőhelyén a hőmérséklet, az oxigénkoncentráció, a kénvegyületek koncentrációja is állandó változásban vannak, modellorganizmusunk nagy alkalmazkodóképességgel rendelkezik (Visscher és mtsai, 1990). Optimális növekedési hőmérséklete 26-29°C, laboratóriumi körülmények között folyadékban 4-6 nap alatt nő fel, míg lemezen 14 nap alatt alkot telepeket.

Jellegzetes rózsaszín színét, aminek tónusa az alkalmazott táptalajtól és a növesztett törzstől függ, a pigmentjeitől kapja, tejszerű állagát pedig a periplazmatikus kénglobulusok adják.

Fotoautotróf növekedése során elektrondonorként kénvegyületeket (szulfid, tioszulfát, elemi kén, poliszulfid, politionát) használ (Visscher és mtsai, 1990; Le Faou és mtsai, 1990), de képes glükóz és szerves savak asszimilációjára is. Mivel, mint az összes bíbor baktérium anaerob fotoszintézist folytat, nem termel oxigént növekedése során, ami gátolná a hidrogenázai működését, expresszióját, összeszerelődését. Csoportunk azért foglalkozik már évtizedek óta ezen organizmus kutatásával, mert megfelelő körülmények között hidrogenáz és nitrogenáz enzimei segítségével fotobiohidrogén termelésre képes (Kovács és mtsai, 2005).

***Thiocapsa roseopersicina* BBS hidrogenázai és azok anyagcsere kapcsolatai**

Kutatásaink alapján a *T. roseopersicina*-nak legalább négy, különböző típusú hidrogenáza van. Stabilitásukban, sejten belüli elhelyezkedésükben, expressziójuk szabályozásában és funkciójukban eltérőek (7. ábra).



7. ábra: A *Thiocapsa roseopersicina* funkcionális hidrogenázai: membránkötött enzimek: Hyn és Hup; citoplazmatikus enzimek: Hox1 és Hox2 (Szőri-Doroházi Emma 2013)

A Hup hidrogenáz

A Hup hidrogenáz fiziológiai feladata a H₂ felvétele (Palágyi-Mészáros és mtsai, 2009). A neve is innen származtatható (hydrogen uptake). Operonja a kis és nagy alegységét kódoló *hupS* és *hupL* génektől 3' irányban, a hidrogenáz érésében és regulációjában szerepet játszó kisegítő fehérjék génjeit (*hupCDHI* és *hupR*) tartalmazza (Kovács és mtsai, 2005). A HupC fehérjének pedig a kinon raktárba irányuló elektrontranszport biztosítása a feladata (7. ábra) (Palágyi-Mészáros és mtsai, 2009).

A Hyn hidrogenáz és anyagcsere kapcsolatai

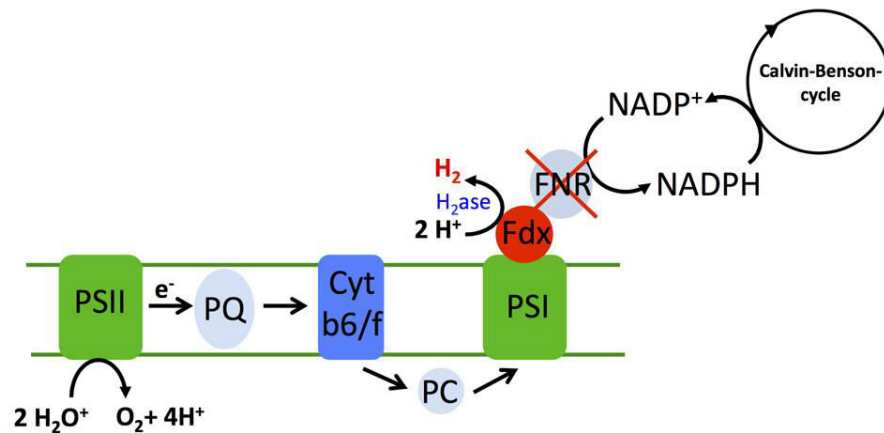
A Hyn hidrogenáz a Hup mellett a másik membránkött hidrogenáz modellorganizmusunkban (Bagyinka és mtsai, 1982; Zorin és Lindblad, 1993; Rákhely és mtsai, 1998). 80°C fölött is mutat *in vitro* aktivitást annak ellenére, hogy a sejtek 30°C felett már nem képesek szaporodásra. Az oxigénnel szembeni ellenállósága a Hyn hidrogenázt biotechnológiai célú felhasználás ideális eszközévé teheti.

A Hyn operon elrendeződése sajátos: a kis és a nagy alegység génje között található két nyitott leolvasási keret (ORF), az *isp1* és *isp2* (Rákhely és mtsai, 1998). Hasonló elrendeződéssel ritkán, de más mikroorganizmusban is találkozunk pl. az *Allochromatium vinosum*-ban (Dahl és mtsai, 1999), hipertermofil *Aquifex aeolicus*-ban (Guiral és mtsai, 2005), valamint az archaebaktériumban, *Acidianus ambivalens*-ben (Laska és mtsai, 2003). Az Isp1 elsődleges szekvenciája hasonlít egyes transzmembrán elektrontranszport fehérjéhez (Rákhely és mtsai, 1998), míg az Isp2, ami egy membránasszociált citoplazmatikus fehérje, a kénoxidáló rendszer DsrK alegységéhez és a heterodiszulfid reduktázok D alegységéhez hasonlít. Az Isp2 aminosav szekvenciájának vizsgálata során kiderült, hogy két - ferredoxin típusú - [FeS]-kocka kötőhelyet tartalmaz (Rákhely és mtsai, 1998), ami alapján joggal feltételezhetjük az Isp2 elektrontranszport funkcióját. A Hyn hidrogenáz Isp alegységeinek hiányában megáll az *in vivo* hidrogéntermelés és csökken a hidrogénfelvétel, míg a HynSL enzim *in vitro* aktivitása sértetlen marad. Ezek alapján az Isp1-2 alegységeknek elektrontranszport szerepük van (7. ábra) (Palágyi-Mészáros és mtsai 2008).

Aquifex aeolicus-ban (Guiral és mtsai, 2005), valamint az *Acidianus ambivalens*-ben (Laska és mtsai, 2003) hidrogenázok és a kénredukció kapcsolatát mutatták ki, amit *T. roseopersicina*-ban is megerősítettek *in vivo* mérésekkel (Laurinavichene és mtsai, 2007). Mivel a Hyn hidrogenáz nem nagyon elterjedt enzim az élővilágban, anyagcsere kapcsolatairól csak az itt ismertetett adatok állnak rendelkezésre, nagyléptékű összehasonlítás ebben a témakörben nem készült.

A Hox1 hidrogenáz és anyagcsere kapcsolatai

Thiocapsa roseopersicina BBS Hox1 hidrogenáza a citoplazmatikus NAD^+ redukáló hidrogenázok közé tartozik (Rákhely és mtsai, 2004), azon belül is a *Synechocystis* (Aubert-Jousset és mtsai, 2011) fajokban és *Gloeocapsa alpicola*-ban (Troshina és mtsai, 2002) fellelhető, a HoxE alegységet tartalmazó változatok közé. A Hox1HY a hidrogenáz kis és nagy alegysége, a Hox1FU a NAD^+ redukcióért felelős diaforáz alegységek (Rákhely és mtsai, 2004) és a Hox1E alegység, ami egy $[2\text{Fe-2S}]$ -kockát tartalmaz és a hidrogenáz aktiválásában/elektrontranszportjában lehet szerepe (7. ábra) (Rákhely és mtsai, 2004, Palágyi-Mészáros és mtsai, 2009; Aubert-Jousset és mtsai, 2011). Ez a hidrogenáz modellorganizmusunk fő hidrogéntermelő hidrogenáza. Egyaránt képes fotoszintetikus és fermentatív körülmények között is hidrogént termelni (Rákhely és mtsai, 2007). Fotoautotróf körülmények között kénvegyületek a Hox1 elektrondonorai, míg sötétben a glükóz, a piroszőlősav és a tartaléktápanyagok járulnak hozzá a hidrogéntermeléshez. A Hox1 képes a hidrogén felvételére is, de a Hup és Hyn hidrogenázok hidrogénfelvevő aktivitásához képest ez nem jelentős (Laurinavichene és mtsai, 2007; Rákhely és mtsai, 2007). Mivel a Hox1 hidrogenáz más modellrendszerekben is elterjedt, lehetséges fiziológiai kapcsolatairól sok adat áll rendelkezésünkre. A legjobban jellemzett modellorganizmusok a cianobaktériumok csoportjába tartozó *Synechocystis* fajok, melyek a bíbor kénbaktériumokkal ellentétben két fotorendszerrel rendelkeznek, és fotoszintézisük során oxigént termelnek. A PSII-ben vízbontásból keletkező elektronok a plasztokinon raktárba kerülnek, ahonnan a citokróm b_6f komplexen keresztül kerülnek a PSI-re miközben protontranszlokáció történik. A PSI-ről az elektronok ferredoxin redukcióra fordítódnak, ami meghajtja a NADP^+ redukcióját a ferredoxin NADP^+ oxidoreduktáz segítségével. A *T. roseopersicina* Hox1 hidrogenázához hasonló enzimek esetén a közvetlen elektrondonor kérdése tisztázatlan volt. Évtizedekig azt gondolták, hogy a NAD(P)H az elektrondonor. Legújabb kutatások alapján az alacsonyabb redoxpotenciálú ferredoxinnak is szerepe van a hidrogéntermelésben, és a 8. ábrán látható modellt állították fel (8. ábra) (Gutekunst és mtsai, 2014).



8. ábra: A Hox hidrogenáz kapcsolata a membrán elektrontranszporttal cianobaktériumokban
(Gutekunst és mtsai 2014)

A Hox2 hidrogenáz

A *T. roseopersicina* genomjában nem csak egyetlen citoplazmatikus NAD^+ redukáló hidrogenáz található. Van egy, a génelrendeződésében a Hox1 hidrogenázhoz hasonló, de csak négy alegységes Hox2 hidrogenáz is. Ezen hidrogenáz érdekessége, hogy expresszióját a glükóz szabályozza és hidrogéntermelése is csak glükóz jelenlétében képes (Maróti és mtsai, 2010). Fontos tulajdonsága, hogy a Hox2 nem rendelkezik HoxE alegységgel, és hidrogéntermelése lényegesen elmarad a Hox1-éhez képest (Maróti és mtsai, 2010).

Célkitűzések

A fototróf bíbor kénbaktériumok hidrogenázainak elektrontranszport kapcsolatai nem teljesen ismertek. Ezért munkám során célul tűztem ki, hogy megvizsgáljam *T. roseopersicina* hidrogéntermelését és a hidrogéntermeléshez kapcsolódó anyagcsereutakat feltérképezsem. Ezen belül, a fotoautotróf körülmények között végbemenő hidrogéntermelés molekuláris mechanizmusára fókuszáljak.

A Hyn hidrogenáz és a fotoszintetikus elektrontranszport kapcsolatának vizsgálata során megválaszoljam azt a kérdést, hogy melyek a Hyn hidrogenáz fő elektrondonorai, azok milyen hierarchikus viszonyban állnak egymással. Megállapítsam, hogy hidrogénfelvétel esetén melyek a Hyn hidrogenáz elektronakceptorai és ezek milyen útvonalon keresztül kapcsolódnak a Hyn hidrogenázhoz, és a membrán redox rendszerhez. Tisztázzam az Isp2 alegység szerepét az elektrontranszportban.

Bár a Hox1 hidrogenáz anyagcsere kapcsolatairól több információ állt rendelkezésünkre, mint a Hyn hidrogenázéről, sok a nyitott kérdés. Céлом volt, hogy részletesen megvizsgáljam, mely kénvegyületek a fotoautotróf körülmények közti hidrogéntermelés elektrondonorjai, és hogy ezek közül melyek a legfontosabbak. A Hyn hidrogenázhoz hasonlóan rámutassak Hox1 hidrogenáz szerepére a sejtanyagcserében, a kapott eredményekből pedig integrált modellt állítsak föl a Hyn és Hox1 hidrogenázok, és a kénanyagcsere közti elektrontranszport kapcsolatáról.

Anyagok és módszerek

Felhasznált baktérium törzsek

Név	Genotípus	Referencia
<i>Escherichia coli</i> törzsek:		
NOVA BLUE	recA1 gyrA96 (F'lacI ^q Z) Tc ^r	Novagene
S17-1 λ pir	294 (<i>recA pro res mod</i>) Tpr Smr (pRP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7)	Herrero és mtsai, 1990
<i>Thiocapsa roseopersicina</i> törzsek:		
BBS	vad típus	Bogorov, 1974
GB2131	ΔHupSL, ΔHoxH Er ^r Gm ^r	Rákhely és mtsai., 2004
GB1121	ΔHupSL, ΔHynSL Sm ^r Gm ^r	Rákhely és mtsai., 2004
GB112131	ΔHupSL, ΔHoxH, ΔHynSL Er ^r Gm ^r Sm ^r	Rákhely és mtsai., 2004
THOE5M	ΔHynSL, ΔHupSL, ΔHoxH törzs+ rekombináns HynSL Er ^r Gm ^r Sm ^r Km ^r	Szőri Dorogházi és mtsai, 2012
Isp2M	GB2131ΔIsp2 Er ^r Gm ^r	Ez a munka
Isp2MpDSKIsp2	Isp2M + pDSKIsp2 plazmid Er ^r Gm ^r Km ^r	Ez a munka

Felhasznált indítószekvenciák

otsh5r	GGCTGCTCCGAGCCGAG
otsh2o4	GCACGCAGCTCGAAAAGAAG
isp2o6	GAGATCCCGGTGGTCGGTCTC
trhynlo2	ACGTATTCCTGGATCTGACC
isp2o1	ATGAGCGAGCTGACACTTG
isp2o2	GGTGCTCGGCGATCAT
otsh6r	GGTGACCGACGCGATGC
otsh7r	CGGCGTTGGTCGCCTCG
isp1o7	TCGCACGCTGGTACAACGGGG
otsh8r	AGCTGTAGGCTTGGGCG

Felhasznált plazmidok

Név	Jellemzők	Forrás
pBluescriptsk (+)	Amp ^r , cloning vector, ColE1	Stratagene
pK18mobsacB	ColE1, <i>sacB</i> , Kmr szűk gazdaspecifitású integrálódó vektor	Schäfer és mtsai, 1994
pK18DSRS1S2	pK18mobsacB + DsrS1-DsrS2 fragment SmaI helyre	Ez a munka.
pDSK509	Széles gazdaspecifitásúklónozó vektor Km ^r	Keen és mtsai, 1988
pBtl2D	pBluescriptsk (+)otsh5r- otsh2o4 PCR termék a BamHI helyre klónozva.	Ez a munka.
pBtlsp2M	pBtl2D + isp2o9-trhynlo2 az EcoRV helyre klónozva.	Ez a munka.
pK18lsp2M	pBtlsp2M EcoRI-XbaI fragmentje a + pK18mobsacB- ba klónozva EcoRI-XbaI helyre.	Ez a munka.
pDSK5crtKm	<i>T. roseopersicina crtD</i> promotere pDSK509-be klónozva	Balogh Tímea személyes közlése.
pBIS2	pBluescriptsk+ +isp2o1-isp2o2 PCR termék SmaI helyre klónozva	Ez a munka.
pDSKlsp2	NdeI-BamHI fragmense apBIS2 plazmidnak pDSK5crtKm vektor helyre klónozva	Ez a munka.

Növesztési körülmények

Escherichia coli növesztési körülmények

Használt oldatok:

LB: 1000 ml LB tápoldathoz 10 g tripton, 5 g élesztő kivonat, 10 g NaCl

LB Lemez: LB tápoldat, 1,5% Bacto-agarral kiegészítve

SOB+Mg²⁺: 1000 ml tápoldathoz 20 g tripton, 5 g élesztő kivonat, 0.5 g NaCl, 10 ml 10 M-os MgSO₄

Az *E. coli* törzsek növesztése 37 °C-on 16 órán keresztül történt, folyadékkultúrában rázatva 150 rpm sebesség mellett 30 ml tápoldatban. Alkalmazott antibiotikum koncentrációk: ampicilin 100 mg/l, kanamicin 25 mg/l

Thiocapsa roseopersicina növesztési körülmények

A *Thiocapsa roseopersicina* törzseket illetve a leoltásokhoz szükséges starter kultúrákat 28 °C-on, folyamatos megvilágítás mellett, teletöltött csiszolt dugós üvegekben, Pfennig féle tápoldatban növesztettem 5 napig. (Pfennig és Trüper, 1992)

Használt oldatok

Pfennig-féle tápoldat (PC): 1000 ml-hez: 20 g NaCl, 1 g KH₂PO₄, 1 g MgCl₂, 1 g KCl, 1 g NH₄Cl, 2 g NaHCO₃, 4 g Na₂S₂O₃, 200 ml (200 µl B12 vitamin (100 µg/ml), 1 ml 20 mM Fe-EDTA, 1 ml mikroelem oldat (Pfennig és Trüpper, 1991). Alkalmazott antibiotikum koncentrációk: kanamicin 25 mg/l, gentamicin 5 mg/l, streptomycin 25 mg/l, eritromicin 50mg/l

Mikroelem-oldat: 1000 ml-hez: 2975 mg Na₂-EDTA, 300 mg H₃BO₄, 200 mg CaCl₂.6 H₂O, 100 mg ZnSO₄.7H₂O, 30 mg MnCl₂.4H₂O, 30 mg Na₂MoO₄.2H₂O, 20 mg NiCl₂.6H₂O, 10 mg CuCl₂.2H₂O (Pfennig és Trüper, 1992)

Escherichia coli kémiai kompetens sejt készítése

A NOVA BLUE illetve S17-1 lambda-pir sejteket 60 ml SOB-ban maximum OD₆₀₀=0,4-ig növesztettem 22 °C-on, ezt követően 10 percre jégre raktam, majd 2500xg-n, 4 °C-on 10 percig

centrifugáltam. Az összegyűlt sejteket jégen tartva 16 ml TB (Pipes: 10 mM, MnCl_2 : 55 mM, CaCl_2 : 15 mM, KCl: 250 mM pH=6,7) pufferben felszuszpendáltam, és újra 2500xg-n, 4 °C-on 10 percig centrifugáltam. A sejteket 4 ml TB pufferben felszuszpendáltam, 300 µl DMSO-t adtam hozzá és 10 percig jégen inkubáltam. Ezután 100 µl térfogategységenként, előre lehűtött mikrocentrifuga csövekbe szétosztva, folyékony nitrogénben fagyasztottam, majd -80 °C-on tároltam őket maximum 1 évig (Inoue és mtsai, 1990).

DNS manipulációs technikák

Genomi DNS izolálás *Thiocapsa roseopersicina*-ból

A genomi DNS tisztításához Sigma „GeneElute Bacterial Genomic DNA Kit” genomi DNS tisztító kitet (kat. szám: NA2100-1KT) használtam. A használat során a gyártó utasításai szerint jártam el.

Plazmid DNS tisztítás *Escherichia coli*-ból

Plazmid izoláláshoz egy kiválasztott telepet antibiotikumot tartalmazó LB tápoldatba oltottam le, majd egész éjszakán át 37°C-on rázatva növesztettem. Az izoláláshoz Sigma „GenElute™ Plasmid Miniprep Kit”-et használtam (kat. szám: PLN350-1KT) Magas kópiaszámú plazmid esetén 1,5 ml sejtéből, alacsony kópiaszámú plazmid esetén 16ml sejtéből indultam ki és két DNS kötő oszlopot használtam. Minden más paraméter tekintetében a gyártó utasításai szerint jártam el. (<http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Bulletin/pln350bul.pdf>)

Agaróz gélelektroforézis

Az analitikai és preparatív célokból végzett gélelektroforézisekhez 1,0%-os, 0.5 µg/ml EtBr-ot tartalmazó agaróz gél-t használtam. A DNS-t 1xTAE pufferben, 100 V feszültséggel futtattam 25 percig.

Fragment izolálás

Az agaróz gélelektroforézist követően a kívánt DNS fragmentet steril penge segítségével kivágtam és 1,5 ml-es eppendorf csőbe raktam. A DNS izolálását a gélből DNS extrakciós kittel (Fermentas, Kat. szám: KO513) végeztem el a gyártó utasításai szerint. Ettől eltérően csak az

elúció során jártam el, mikor 10 µl desztillált vizet raktam a szilika porra és 55 C°-on inkubáltam 5 percig, gyakran keverve, majd a centrifugálás (13000 rpm, 5 perc) után a DNS oldatot másik centrifugacsőbe vittem át. Az elúciós folyamatot megismételtem, majd a DNS oldatokat egyesítettem.

PCR reakció

Eppendorf 5415R típusú készülékben végeztem a reakciókat. Az alábbi koncentrációjú összetevőkből állt a reakciókeverék: indítószekvenciák (1pmol/µl), 0,2mM-os dNTP, 10 x higított DNS polimeráz puffer valamint 0,2µl Pfu (Thermo Scientific) DNS polimeráz. 20 µl végtérfogatban dolgoztam. Templátként 2µl DNS oldatot használtam, ami vagy 1000x higított plazmid, vagy nem higított genomi DNS (Sigma Gene Elute Bacterial Genomic Kit) vagy kolónia PCR esetében sejtszuszpenzió (1 kolóniát 100µl vízben szuszpendáltam majd 10 percig 95 C°-on főztem) volt. Egy tipikus programciklus: 1 perc 95 °, 1 perc 60 C°, 1 perc 72 C°. A denaturációs, hibridizációs, elongációs lépéseket 30x ismételtem, majd a záróciklus: 5 perc 72 C° volt. Abban az esetben, amikor a klónok ellenőrzéséhez végeztem 0,3 µl DyNAzyme (Thermo Scientific) enzimet használtam.

Restrikciós emésztés

A restrikciós emésztéseket Fermentas „fast digest” enzimekkel végeztem az „fast digest green” pufferében a gyártó útmutatásai alapján. (<http://www.thermoscientificbio.com>)

PCR termék foszforilálása

A DNS molekulák 5' végi foszforilálását Fermentas T4 PNK (T4 Polynucleotide Kinase) enzimmel végeztem a gyártó útmutatásai alapján. (<http://www.thermoscientificbio.com>)

Emésztett vektor defoszforilálása

Az izolált lineáris vektorokat a Fermentas gyártmányú FastAP alkalikus foszfatázzal kezeltem a gyártó útmutatásai alapján (<http://www.thermoscientificbio.com>). A javasolt útmutatástól eltérően 12 órát inkubáltam mintákat.

Ligálás

A ligálási reakciók során Fermentas T4 DNS ligáz enzimet használtam 2U/reakció koncentrációban. A ligálásokat 18 °C-on végeztem legalább 16 órán keresztül.

Transzformálás

A transzformálni kívánt DNS-t 100 µl jégen felolvasztott *E. coli* NOVABLUÉ kompetens sejtekhez adtam. 30 percig jégen tartottam, majd 40 másodperces 42 °C-os hősokk után 900 µl SOB+Mg²⁺-ot adtam a sejtekhez. 1órás 37 °C-on történő rázatás után, a plazmid által hordozott antibiotikum rezisztencia génnek megfelelő antibiotikummal kiegészített lemezre szélesztettem a sejteket és normál növesztési körülményeknek megfelelően tartottam őket a jól látható telepképzésig (16-20 óra).

Konjugálás

A konjugációhoz a *T. roseopersicina* törzseket 28 °C-on 3 napig neveltem. Az *E. coli*-t 37 °C-on OD₆₀₀=0,6-ig, rezisztenciájuknak megfelelő antibiotikummal kiegészített tápoldaton növesztettem. A sejteket centrifugálással gyűjtöttem össze, majd kétszer mostam 10 ml PC tápoldattal. A harmadik mosás alkalmával, a centrifugálást követően, egy kevés PC tápoldatban szuszpendáltam a sejteket, amit egyesítettem. Az így kapott „sejtelegyet” konjugációs lemezre (2 g/l Nutrient Broth-ot és 2 g/l Na-acetátot tartalmazó, 1,5% agarral szilárdított Pfennig-féle táptalaj) cseppentettem és géles állagúra beszárítottam (Pfennig és mts., 1992). Ezeket a lemezeket 24 órán át fényen, levegőn, 28 °C-on inkubáltam.

Másnap a beszáradt sejteket átvittem PC tápoldatba, felszuszpendáltam és ebből a szuszpenzióból hígítási sort készítettem a tápoldattal, majd 100-100 µl-t szélesztettem ki antibiotikum tartalmú PCA szelektív lemezre (2 g/l Na-acetátot tartalmazó, phytagéllal szilárdított Pfennig-féle táptalaj) szélesztettem. Az így kapott lemezeket anaerob dobozokba (Oxoid, melyet Oxoid anaerogen AN0025A katalógusszámú anaerobizálóval mentesítettem az oxigéntől) helyeztem és folyamatos megvilágítás mellett 14-21 napig, 28 °C-on növesztettem.

Mutagenézis és komplementációs technikák

Az *isp2* gén mutagenézise

A leolvasási keretet megtartó deléció mutagenézishez PCR segítségével felszorzozott otsh5r- otsh2o4 indítószekvenciák közé eső szakaszt (az *isp2* gén 5' régióját és a géntől 5' irányban elhelyezkedő régió) pBluescript SK(+) vektor tompított, defoszforilált BamHI restrikciós helyére klónoztam. Ezzel létrejött apBtl2D konstrukció. A isp2o9 és trhynlo2 indítószekvenciák segítségével felszorzozott 3' homológ régiót foszforilálás után pBtl2Dplazmid defoszforilált EcoRV helyére klónoztam. A termék neve pBtlsp2M lett. A pBtlsp2M EcoRI-XbaI fragmentjének pK18mobsacB vektorba történő áthelyezése után kaptam a pK18isp2M konstrukciót. Ezt S17-1 λ -pir*E. coli* törzsbe transzformáltam, majd konjugálással GB2131 törzsbe juttattam. Az elsődleges rekombinánsokat kanamicin tartalmú lemezen szelektáltam, a klónokat PCR-rel ellenőriztem. A kanamicin rezisztens és PCR alapján a kívánt konstrukciót tartalmazó törzseket kanamicin nélküli tápoldatban történt négyszer egymás utáni felnövesztést követően, kanamicin mentes lemezre szélesztettem 1000x-es hígításban. A kapott kolóniák közül kisselektáltam a kanamicin érzékenyeket és a genotípusukat Isp1o7–otsh8r indítószekvencia párokkal végzett PCR-el ellenőriztem. A homológ régiók közé eső genomi régiót nem tartalmazó (Δ *isp2*) törzseket otsh6r – otsh7r, otsh5r - otsh7r indítószekvencia párokkal végzett PCR reakciókkal igazoltam.

Az *isp2* deléciójának homológ komplementációja

Az isp2o1-isp2o2 indítószekvenciák PCR termékét pBluescriptSK(+) SmaI helyére ligáltam, ekkor kaptam meg a pBIS2 konstrukciót, amiből az NdeI-BamHI fragmentet pDSK509CrtKm5 vektorba ligáltam. Ezt pDSKisp2-nekelnevezett konstrukciót S17 λ -pir sejt segítségével *T. roseoerpersicina* Isp2M törzsébe juttattam konjugációval.

Mérési módszerek

In vivo hidrogéntermelés és felvétel mérése

A baktérium törzseket módosított Pfennig-féle tápoldatba oltottam le, 125 ml es szérüművegekbe, ezután nitrogén gázzal anaerobizáltam a lezárt üvegeket. Elemi kénen történő növesztés esetén 100 ml 0,25 g/l NaHCO_3 -ot és 5 μM NiCl_2 tartalmazó, tioszulfát mentes Pfennig féle tápoldatot használtam. Tioszulfáton történő növesztés és tápoldatváltás nélküli hidrogéntermelés mérésehez 60 ml 5 μM NiCl_2 tartalmú Pfennig-féle tápoldatba oltottam sejteket, majd a 3. napon újra átfúvattam a minták légterét és az utána termelődött hidrogén mennyiségét határoztam meg.

Az endogén elemi kénen történő hidrogéntermelés meghatározásához 60mM nátrium tioszulfát tartalmú módosított Pfennig féle tápoldatba oltottam le a törzseket, majd a 4. napon centriufugálási (2x7 perc 8000 rpm) és mosási lépés segítségével lecseréltem a tápoldatot tioszulfát és karbonátmentes tápoldatra. Ebből 100 ml kultúrát töltöttem 125 ml-es szérüművegekbe, amiknek lezárása után szintén nitrogénnel lecseréltem a légteret.

A CCCP hatásának meghatározásához 60 ml-es üvegeket használtam, amikbe 47 ml a fentiekben leírt módon előkészített sejtet helyeztem. A hidrogén és kénhidrogén termelést 1 nap után határoztam meg.

Hidrogén felvételi mérés esetén a GB2131 törzset úgy növesztettem föl, hogy kénglobulusokat ne raktározzon. A fentiekben ismertetett centrifugálási lépéseket követően 100ml sejtet 125ml-es szérüművegbe helyeztem, majd kétszeri anaerobizálás után 2ml hidrogént fecskendeztem a légtérbe, és utána megmértem a hidrogén mennyiségét.

A hidrogéntermelés és felvétel meghatározásához minták légtéréből gázzáró Hamilton mikrofecskendővel 500 μl -t fecskendeztem gázkromatográfba. Agilent 6890 gázkromatográf, Molekular sieve 5 $\text{\AA}$ (30m*0,53mm*530 μm) kolonna, argon vivógáz, 16,9 ml/perc áramlási sebesség, 60 °C kolonna tér hőmérséklet, 160 °C TCD detektor hőmérséklet. (http://www.restek.com/chromatogram/view/GC_PC00170/1333-74-).

***In vivo* kénhidrogén termelés mérése**

Az *in vivo* hidrogéntermelés fejezetben leírt növesztési körülményeket alkalmaztam. Hamilton mikrofecskendővel 100 µl-t fecskendeztem gázkromatográfba a minták légtéréből. Shimadzu GC-2010 típusú gázkromatográf, split 0,5:1. 76,4 ml/perc áramlási sebesség, nitrogén vivőgáz, PLOT-Q kolonna (30 m X 0,35 mm X 0,4 µm), 120 °C kolonna tér hőmérséklet, 150°C – os hővezetőképeségi (TCD) detektor, detektorhőmérséklet) (<http://www.chem.agilent.com/en-US/products-services/Columns-Sample-Preparation/GC-GC-MS-Columns/Capillary/HP-PLOT-Q/Pages/default.aspx>).

Szulfát mennyiség meghatározása

A szulfát meghatározását folyadékkromatográffal végeztem. 1 ml mintát vettem a kultúrákból, majd 13000 rpm, 10 perc centrifugálás után HPLC mintatartóba pipettáztam a felülúszót. Az elválasztáshoz Transgenomic IC Sep AN1SC oszlopot használtam. Eluensként 300 mM bórsavat, 1,5 mM ftálsavat, 1,38 mM Trist-t tartalmazó pH=5,5 oldatot alkalmaztam 1 ml/perc áramlási sebességgel. Az oszlop termosztát hőmérséklete 30 C° volt. A detektálás indirekt UV módban történt 263 nm-en (Rethmeier és mtsai, 1997).

Hyn hidrogenáz mennyiségének meghatározásához szükséges technikák

Sejtfeltárás szonikálással

60ml sejt kultúrát centrifugáltam, majd 1,5 ml foszfát pufferben (20mM KH₂PO₄, pH = 7,0) szuszpendáltam fel. A jégen álló sejteket 4 x 20 másodperces szonikálási ciklussal tartam föl (Bandelin Sonoplus szonikátor MS 72-es szonikálófejjel felszerelve 80% os amplitúdó-val). A ciklusok között 15 másodperc szünet volt. Ezután a feltáratlan sejteket és a kénkristályokat centrifugáltam (10 perc 15000xg-n)(Szőri-Dorogházi és mtsai, 2012).

Fehérje mennyiségi mérése Lowry módszerrel

A fehérjéket triklórecetsavval való kicsapás után 800µl 0,25M NaOH-ban oldottam fel, majd a reagensből (6% Na₂CO₃: 1,5 % CaSO₄ (50:1 arányban) + 3% Na-citrát) 300µl-t adtam a fehérje oldathoz és keverés után 15 percig szobahőmérsékleten tartottam. Ezután 100µl 72%-os Folin C reagenst adtam hozzá és 30 perc inkubálás után 750 nm-en mértem a fényelnyelést. Az

ismeretlen minták koncentrációját borjú szérum albuminnal készített kalibrációs egyenes alapján állapítottam meg (Lowry és mtsai, 1951).

Western blot

A Hyn enzim mennyiségi analizésére Western blot technikát alkalmaztam. Első lépésben denaturáló Invitrogen NuPage 10% BisTris 1,5% (Kat. Szám: NP0301BOX) gyári öntésű gélt használtam a 35µg fehérje elválasztására. A futtatáshoz Invitrogen 20x NuPage MOPS-SDS futtató puffert (Cat. No: NP0001) használtam. A gélt futtatás után transzferpufferben áztattam (Invitrogen 20xNuPage transzfer puffer Cat. No: NP0006-1). A blottolást nedves blottolóval végeztem (Biorad Z352837) 30V feszültségen egy éjszakán át. A nitrocellulóz membránt 5% sovány tejport tartalmazó 1x TBST (20 xTBST: 200ml Tris pH=7,4 + 18g NaCl + 1% Tween 20) oldatban rázattam 1 órán át, majd újabb egy órán át inkubáltam 5% tejport és 10000-szeres higítású anti-HupL poliklononális tisztított fehérje ellen nyálban termeltetett ellenanyagot tartalmazó oldatban (a nem specifikusan kötődő anyagokat az ezt követő 4x5 perces 1xTBST-s mosással távolítottam el). Ezután adtam hozzá a másodlagos ellenanyagot (anti-nyúl IgG torna peroxidázzal konjugálva, 20 ml 5% tejport tartalmazó TBST-ben 1:5000 higításban), 1 óráig enyhén rázattam, majd 4x5 percig mostam TBST oldattal. A membrán előhívása 2ml SuperSignal Detektációs kit (Pierce PROD# 34083) luminol:peroxid oldat 1:1 arányú keverékével történt (Szőri-Dorogházi és mtsai, 2012). A kép rögzítését Bio-Rad VersaDoc 4000 gél dokumentációs rendszerrel végeztem 15 perces expozíciós idővel és 15 perces zajsűréssel.

Kénanyagcserében szerepet játszó gének keresése és annotálása a genomi szekvencia alapján

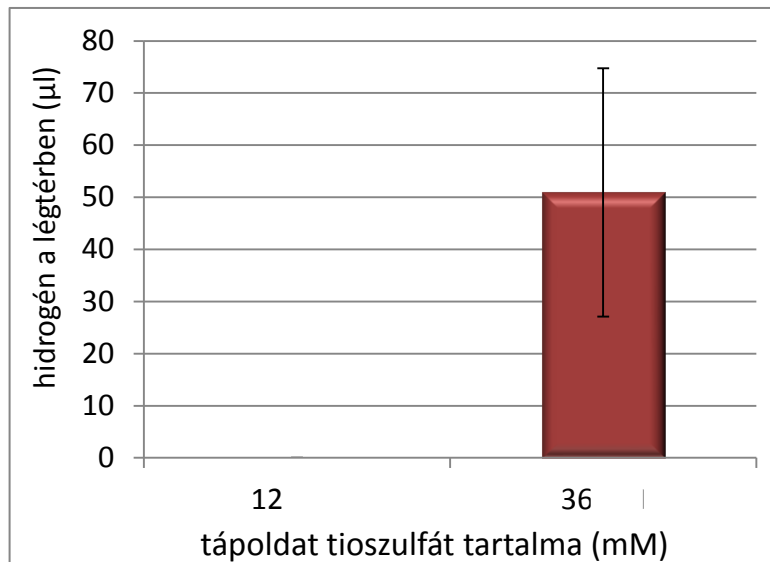
A kém anyagcserében szerepet játszó gének kereséséhez tanszékünk számítógépére telepített BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) programot és a közel 200 kontigot tartalmazó, a teljes *T. roseopersicina* genomot reprezentáló Ace47-es genomszekvencia verziót használtam. A rendelkezésre álló szakirodalmi és szekvenciaadatok alapján a potenciális jelölt génekkel TBASTX szekvencia keresést végeztem. Az így azonosított genomi régiók valamint a hozzájuk tartozó (± 4000 bp) határoló szakaszok bázissorrendjét Clone Manager programba másoltam, majd meghatároztam a potenciális nyílt leolvasási kereteket (ORF). Az így nyert ORF-ekről *in silico* fehérje szekvenciákat az NCBI online Blast keresőmotorja (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) segítségével „Swissprot” és „Non-redundant protein sequences” adatbázisokkal szemben futattam meg BLASTP üzemmódban. A kapott találatokat legalább 30%-os aminosav-sorrend egyezés esetén fogadtam el.

Eredmények

A Hyn hidrogenáz anyagcsere kapcsolatai

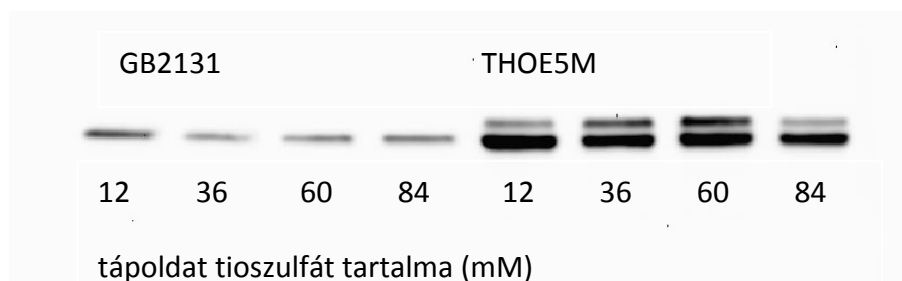
A Hyn hidrogenáz hidrogéntermelésének nátrium-tioszulfát függése

Egy hidrogenáz anyagcsere kapcsolatainak felderítése a hidrogéntermelés fiziológiás elektrondonorjainak megkeresésével veszi kezdetét. Ehhez a Hyn hidrogenáz esetén *Thiocapsa roseopersicina* GB2131 törzsét használtam, mely aktív formában csak a Hyn hidrogenázt tartalmazta. A sejteket különböző mennyiségű tioszulfát mellett neveltem. Azt találtam, hogy ha a leoltástól számított 3. és 6. nap közötti hidrogéntermelést határoztam meg, akkor a Hyn 12mM tioszulfát jelenlétében nem, csak 36mM tioszulfát jelenlétében képes hidrogéntermelésre (9. ábra).



9. ábra: GB2131 törzs 3-6 nap közötti hidrogéntermelésének tioszulfát függése megvilágítás alatt

Kérdésként merült fel, hogy a tioszulfátnak szabályozó szerepe van-e a Hyn mennyiségére nézve, és több hidrogenáz esetén termelődik-e több hidrogén. Hyn specifikus western analízist végeztem GB2131 és THOE5M törzsön. A THOE5M törzs plazmid konstrukción tartalmazza a Hyn hidrogenáz génjét, kifejeződése a saját promótere által szabályozott, és több hidrogént termel, mint a GB2131 ld. alább: (12., 13. ábra).



10. ábra Hyn hidrogenáz mennyiségének követése HynL specifikus Western analízissel A Western blot képen elsősorban a THOE5M törzs esetén két csík látható. A felső a nem aktív, még éretlen hidrogenáz, míg az alsó, az aktív hidrogenázhoz rendelhető.

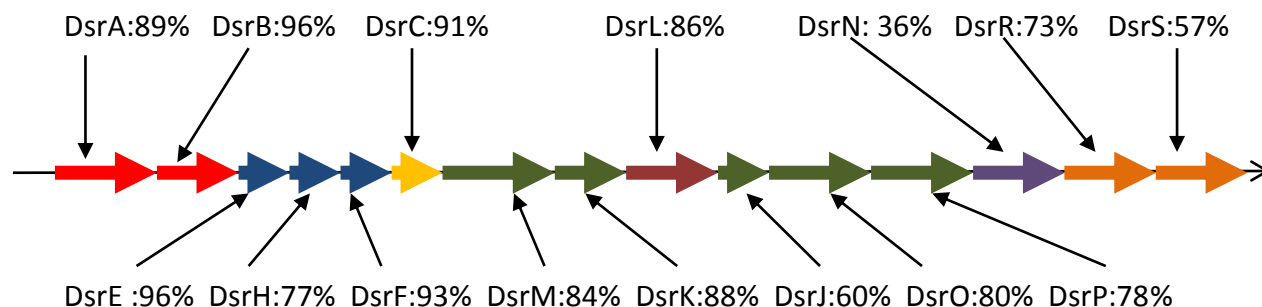
Az 10. ábrán látható, hogy egyik törzs esetében sincs változás a Hyn mennyiségében a tápoldat tioszulfát koncentrációjának függvényében, viszont a két törzs Hyn tartalma között egy nagyságrendi különbség van. Ez magyarázatul szolgál a köztük lévő hidrogéntermelésbeli különbségre és arra utal, hogy a tioszulfát úgy növeli a hidrogéntermelést, hogy megnöveli a Hyn irányába az elektronfluxust.

***Thiocapsa roseopersicina* kénanyagcsere modelljének felállítása és a legfontosabb operonok bioinformatikai analízise**

Azon kérdések megválaszolásához, hogy milyen lépésekből áll a tioszulfát asszimilációja, és hogyan képes elektronokat juttatni a Hyn hidrogenázra, modellorganizmusunk kénanyagcsere modelljének felállítása vált szükségessé.

A *T. roseopersicina* kénanyagcseréjében szerepet játszó fehérjék kódoló régiói munkám kezdetén még ismeretlenek voltak. Egy koherens anyagcseremodell felállítása érdekében a gének *in silico* azonosítását kezdtem meg. Arra az eredményre jutottam, hogy modellorganizmusunk kénanyagcseréje a genomanalízis szerint megegyezik a részletesen tanulmányozott *Allochromatium vinosum* kénanyagcseréjével (4. ábra) (Stockdreher és mtsai, 2012). Az *in silico* analízis mellett a modell alkalmazhatóságát *T. roseopersicina*-ra későbbi *in vivo* mérési eredményeim is alátámasztották.

Legfontosabb azonosság a *T. roseopersicina*-ban is megtalálható a kénoxidációban szerepet játszó Dsr enzimrendszert kódoló *dsr* lókus. A géntermékek komoly hasonlóságot mutatnak a két mikroorganizmusban, bár az azonossági értékek néhány esetben alacsonyabbnak bizonyultak (DsrN; DsrS).



11. ábra: *T. roseopersicina* *dsr* lókusának vázlata, a származtatott fehérjeszekvenciák *A. vinosum* azonos géntermékekhez mutatott hasonlósági értékeivel

Az 11. ábrán jól látható, hogy a strukturális elemek (DsrA-P) mutatják a nagyobb hasonlóságot, ezek közül csak a DsrJ 60%-os azonossági értéke a kiugró, de ez is – az *A. vinosum* DsrJ fehérjeszekvenciához hasonlóan – a tri-hem citokrómokhoz mutat hasonlóságot (Sander és mtsai, 2006). A strukturgénekkel szemben a sirohem szintéziséért felelős DsrN (Lübbe és mtsai, 2006) mutatja a legkisebb hasonlósági értéket (36%), ez összhangban lehet azzal, hogy hiányában csak jelentősen csökken a kénoxidáció (Lübbe és mtsai, 2006). A poszttranszkripció szabályozásban részt vevő DsrR és S fehérjék (Grimm és mtsai, 2011) a struktúrfehérjékhez képest kisebb hasonlóságot mutatnak (73% és 57%) az *A. vinosum* megfelelő szekvenciáihoz. Összességében a 11. ábra jól szemlélteti a két organizmus *dsr* lókusának hasonlóságát, ami *T. roseopersicina* és *A. vinosum* kénanyagcseréjének azonos működését sugallja. *T. roseopersicina* genomszekvenciájában azonosítottam a tioszulfát asszimilációért felelős Sox ciklus génjeit, a szulfid oxidációt végző SoeABC (Dahl és mtsai, 2013) komplexet, AprMA és Sat lókus fehérjét (Kappler és Dahl, 2001) kódoló géneket, illetve kollégáim azonosították a szulfid oxidációért felelős Fcc; Sqr1, Sqr2 fehérjék génjeit. A többi szekvencia részletes analizésére ki se térnék, mert az elemek az *in silico* analízis alapján megegyeznek a kénanyagcsere többi lépésének az irodalmi áttekintésben ismertetett elemeivel.

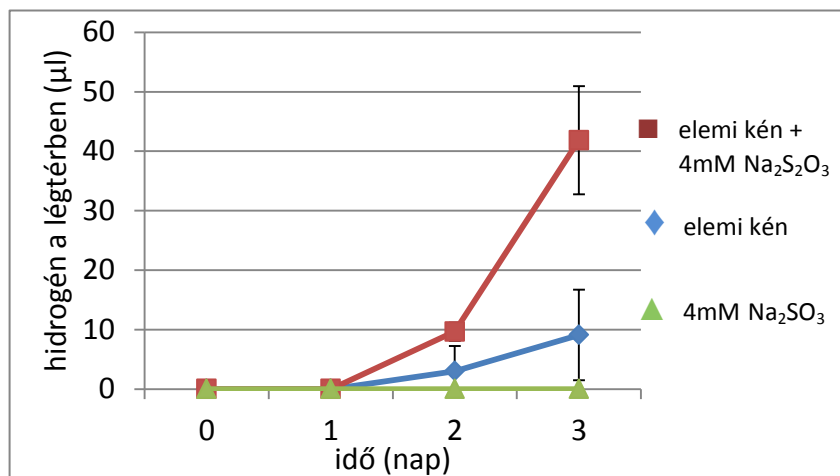
Ami nehézséget okozott, az a kénhidrogén termelésért felelős elem azonosítása volt. Modellorganizmusunkban legalább négy molibdoprotein családba tartozó fehérje génje van. Ezek közül kettő a nitrát reduktázokkal mutatott számottevő hasonlóságot, egy pedig gyakorlatilag megegyezik az *A. vinosum*-ban azonosított SoeABC komplex génjeivel (Dahl és mtsai, 2013). A negyedik molibdoprotein fehérjét kódoló gén pedig az *Acidianus ambivalens* kénreduktázának katalitikus alegységéhez hasonlított (Laska és mtsai, 2003), de a többi alegység ebben a lókuszban nem volt megtalálható. Azt, hogy melyik gén és melyik géntermék felelős a kénhidrogén termelésért, kísérletileg vizsgáltam meg. Ennek ismertetése a dolgozat későbbi fejezetében található.

Amiben viszont eltérés tapasztalható az *A. vinosum* és a *T. roseopersicina* kénanyagcserében szerepet játszó génjei között, az a gének kópiaszáma. Ilyen például a tioszulfát asszimilációért felelős Sox ciklus fehérjéit kódoló génnek az esete. A SoxXA fehérjék génjei két példányban vannak jelen, és a második példány elemei fehérjeszekvencia szinten 70 és 57%-ban azonosak a *Thioalkalivibrio nitratireducens* DSM 14787 törzs SoxXA fehérjéinek szekvenciáihoz. Ezzel szemben az *Allochromatium vinosum* SoxXA fehérjéhez 27 és 32%-ban mutatnak azonosságot, míg a modellorganizmusunk *A. vinosum* SoxAX-éhez jobban hasonló SoxAX-e között és a referenciának tekintett *A. vinosum* SoxAX között 70 és 64%-os az azonosság. A tioszulfát asszimiláció másik kulcsenzime, a SoxYZ esetén is hasonló képet láthatunk. Egyik SoxYZ esetében (*A. vinosum* SoxYZ-jére jobban hasonlító SoxYZ) 68 és 79 %-os azonosság tapasztalható az *A. vinosum* SoxYZ fehérje szekvenciájához viszonyítva, míg a második SoxYZ 39 és 54%-ban azonos a *Methylibium sp.* és *Janthinobacterium sp.* SoxY és Z fehérjéivel. Ebben az esetben az *A. vinosum* azonos fehérjéivel csak 34 és 43%-os azonossági értéket kaptunk.

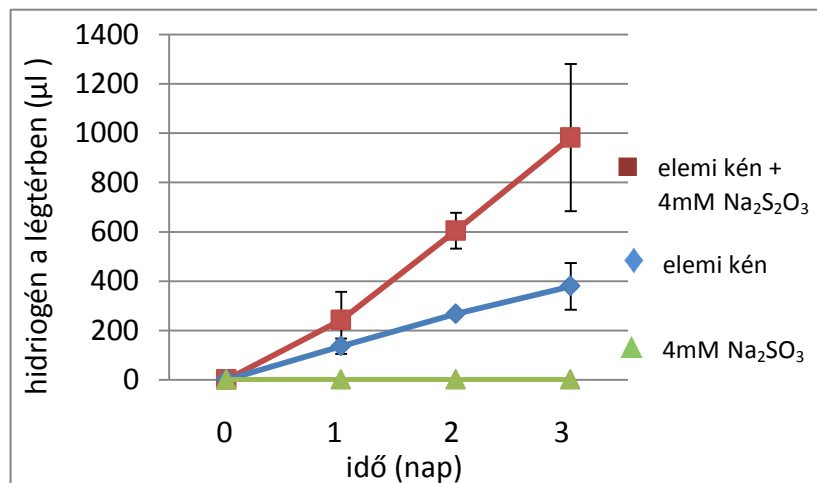
A Hyn hidrogenáz hidrogéntermelésének elektrondonorai

Az *A. vinosum* és ennek megfelelően *T. roseopersicina* kénanyagcseréjének ismeretében (4. ábra) át tudjuk tekinteni, hogy a tioszulfát felhasználásának mely lépései juttathatnak elektronokat a Hyn hidrogenázhoz. Ezek a tioszulfát asszimilációja, a kén oxidációja, és a szulfit oxidációja. Hogy letezteljem, mely köztitermékek a tényleges elektrondonorok a

hidrogéntermeléshez, a GB2131 és a THOE5M törzseket olyan körülmények között növesztettem fel, hogy nagy mennyiségű kénglobulust raktározzanak (60mM tioszulfát). Ekkor a sejtek tápoldatát lecseréltem szénforrást és elektrondonort nem tartalmazó tápközegre, majd követtem a hidrogén és kénhidrogén termelésüket.



12. ábra: GB2131 törzs hidrogéntermelése különböző elektrondonorok jelenlétében



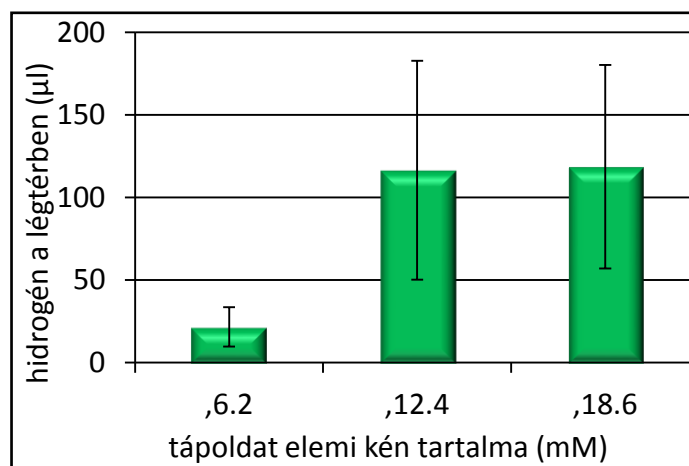
13. ábra: THOE5M törzs hidrogéntermelése különböző elektrondonorok jelenlétében

Azt találtam, hogy a Hyn hidrogenáz képes elemi kén jelenlétében, mint kizárólagos elektrondonoron hidrogént termelni (12. és 13. ábra), viszont a hozzáadott nátrium-tioszulfát a hidrogéntermelését drasztikusan megnövelte, mindkét törzs esetében. Ezért a tioszulfát asszimiláció és a kén oxidáció párhuzamosan képesek elektronokat juttatni a Hyn

hidrogenáznak, továbbá a két útvonal közül a tioszulfát asszimiláció látszik fontosabbnak. Fontos megjegyezni, hogy tioszulfátból képződik elemi kén, de a hidrogéntermelés növekmény minden valószínűség szerint nem a megnövekedett kénmennyiség, hanem a tioszulfát oxidációjából származik.

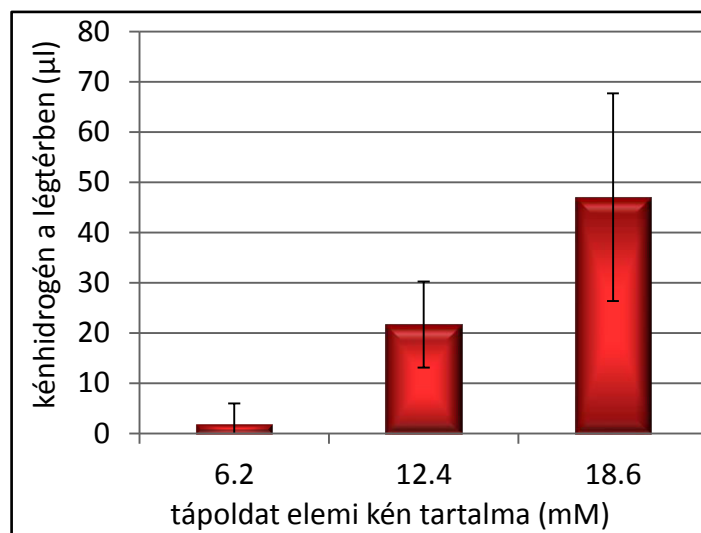
Ezen kísérletekkel párhuzamosan megvizsgáltam a szulfit szerepét a hidrogéntermelésben úgy, hogy a törzseket felneveltem olyan körülmények között, hogy kénglobulust ne tartalmazzanak, majd tápoldatváltás után szulfitot, mint kizárólagos elektrondonort adtam a sejtekhez. Ezen körülmények között hidrogéntermelést nem tapasztaltam, tehát a szulfit oxidáció nem tud elektronokat juttatni a Hyn hidrogenázhoz (12. és 13. ábra).

Eredményeim megerősítéseként megvizsgáltam a Hyn hidrogenáz hidrogéntermelését exogén elemi kén jelenlétében is. Hogy ezt a jelenséget vizsgálni tudjuk le kellett csökkenteni a tápoldat karbonát tartalmát, mert 2g/l nátrium hidrogén karbonát jelenlétében, a karbonát felhasználásához szükséges elemi kén elsötétítette volna a tápoldatot (adatokat nem tüntetem fel). Ez pedig gátolta volna mind a növekedést, mind a hidrogéntermelést. A Hyn hidrogenáz képes kolloidális elemi kénen hidrogéntermelésre (14. ábra), ami alátámasztja, hogy a kén oxidációja képes elektronokat juttatni a Hyn hidrogenáz hidrogéntermeléséhez.



14. ábra: THOE5M törzs hidrogéntermelése kolloidális elemi kénen, mint kizárólagos elektrondonoron

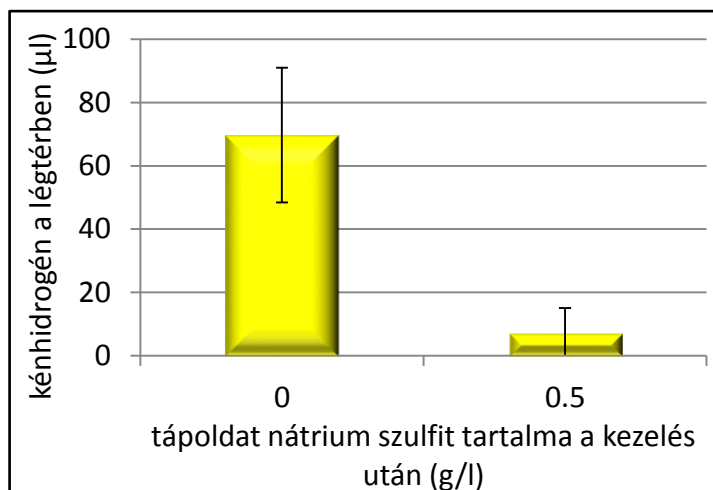
A hidrogéntermelés és szulfidasszimiláció közti összefüggés tisztázása érdekében megvizsgáltam modellorganizmusunk kénhidrogén termelését (15. ábra).



15. ábra: THOE5M törzs kénhidrogén termelése a tápoldat kéntartalmának függvényében

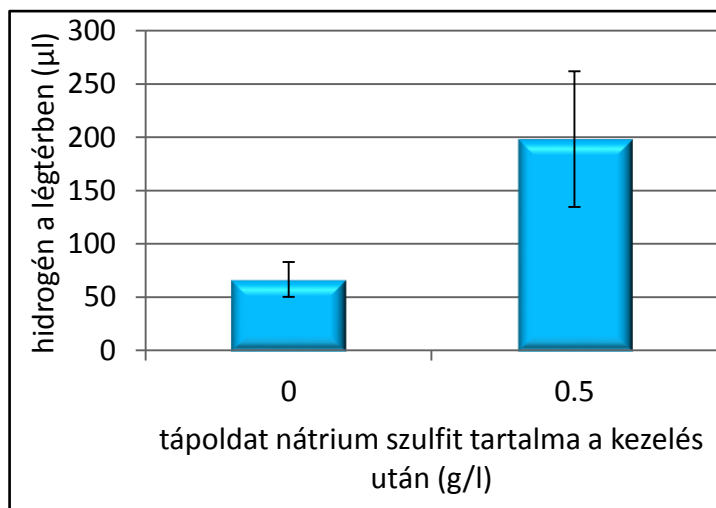
A 14. és 15. ábra összevetéséből látszik, hogy a kénhidrogén termelés és a hidrogéntermelés párhuzamosan növekszik.

A hidrogén- és szulfidmetabolizmus kapcsolatának pontosításához megvizsgáltam a szulfid szerepét a Hyn hidrogéntermelésében. Mivel a hozzáadott nátrium szulfiddal végzett kísérletek nem vezettek eredményre (a mérésen belüli szórás kezelhetetlen mértékűre emelkedett szulfid hozzáadás hatására), a termelődő szulfid eliminálásával próbálkoztam. A leoltástól számított 4. napon nátrium-szulfidot adtam a tápoldatba, ami a szulfiddal és a kolloidális exogén elemi kénnel elreagálva tioszulfátot képezett. Mivel a szulfid szint csökkent a folyadékfázisban és a szulfid dinamikus egyensúlyban van a légtérben lévő kénhidrogénnel, követni tudtuk a csökkenést (16. ábra).



16. ábra: THOE5M törzs kénhidrogén termelésének alakulása hozzáadott nátrium szulfid hatására

A 16. ábra egyértelműen mutatja, hogy a kénhidrogén koncentráció jelentősen lecsökkent a szulfid hozzáadásának hatására. Ugyanezen mintákból a leoltástól számított 6. napon a kénhidrogén meghatározással egy időben megmértem a termelődött hidrogén mennyiségét.

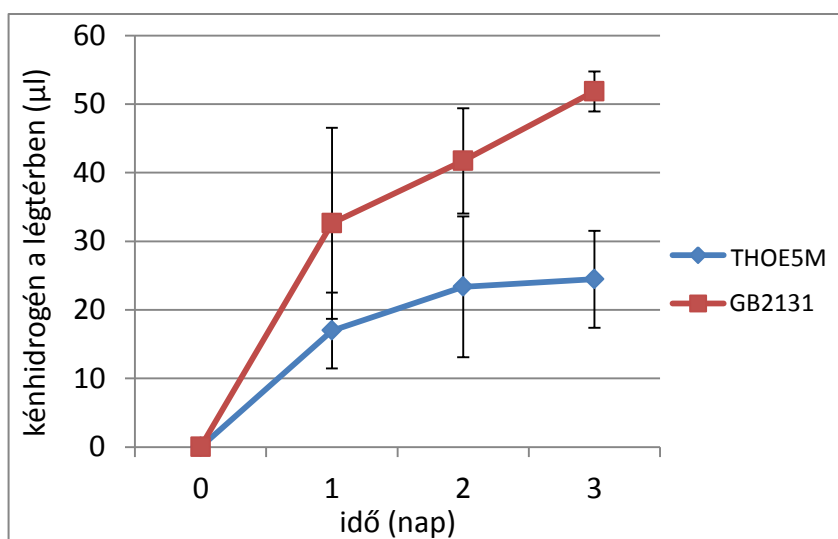


17. ábra: THOE5M törzs hidrogéntermelésének alakulása hozzáadott nátrium szulfid hatására

Mint a 17. ábrán látható, hogy a hidrogéntermelés nem, hogy nem csökkent, amikor elimináltam a termelőző szulfidot a tápoldatból (16. ábra), de még emelkedett is. Ez annak tudható be, hogy a szulfidnak nincs közvetlen szerepe a Hyn hidrogéntermelésében, viszont a keletkező tioszulfátnak igen. Ez összhangban áll a fentebbi állításokkal, miszerint a tioszulfát a Hyn fő elektrondonora.

Kapcsolat a Hyn hidrogenáz és a kénhidrogén termelés között

Mivel a kénhidrogén termelés egyidejűleg történik a hidrogéntermeléssel, viszont nem szükséges hozzá, a köztük lévő kapcsolat lehet antiparallel/kompetitív is. Ezt úgy vizsgáltam, hogy összehasonlítottam a fentebbi tápoldatváltásos kísérletben használt, endogén elemi kén, mint kizárólagos elektrondonort tartalmazó minták kénhidrogén- és hidrogéntermelését (18. ábra).

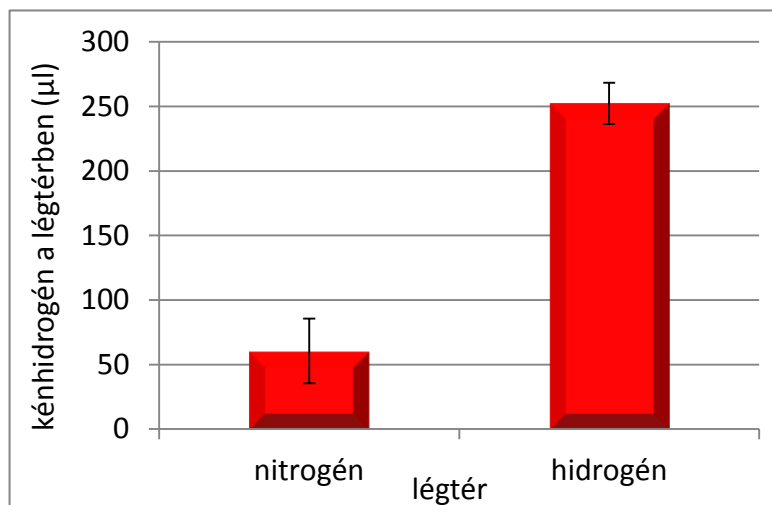


18. ábra: Hyn hidrogenázt tartalmazó törzsek kénhidrogén termelése elemi kén, mint kizárólagos elektrondonor jelenlétében

A THOE5M törzs 390 μl-rel több hidrogént viszont 25 μl-rel kevesebb kénhidrogént termelt, mint a GB2131 törzs (13, 18. ábra). Kísérletileg megállapítottam, hogy a megoszlási hányados $4,62 \pm 0,5 / 1$ a folyadék fázis javára, azaz a folyadékfázisban közel ötször annyi kénhidrogén van, mint a gázfázisban. Láthatjuk, hogy nincs nagyságrendi eltérés a

hidrogéntermelés és a kénhidrogén termelés változása között, igaz, pontos sztöchiometria nem igazán számítható. Természetesen lehetnek, vannak olyan anyagcsere útvonalak, amik más úton képesek elvezetni a többletelektronokat. Ezek alapján megállapítható, hogy a hidrogén- és kénhidrogén termelés kompetitív folyamatok.

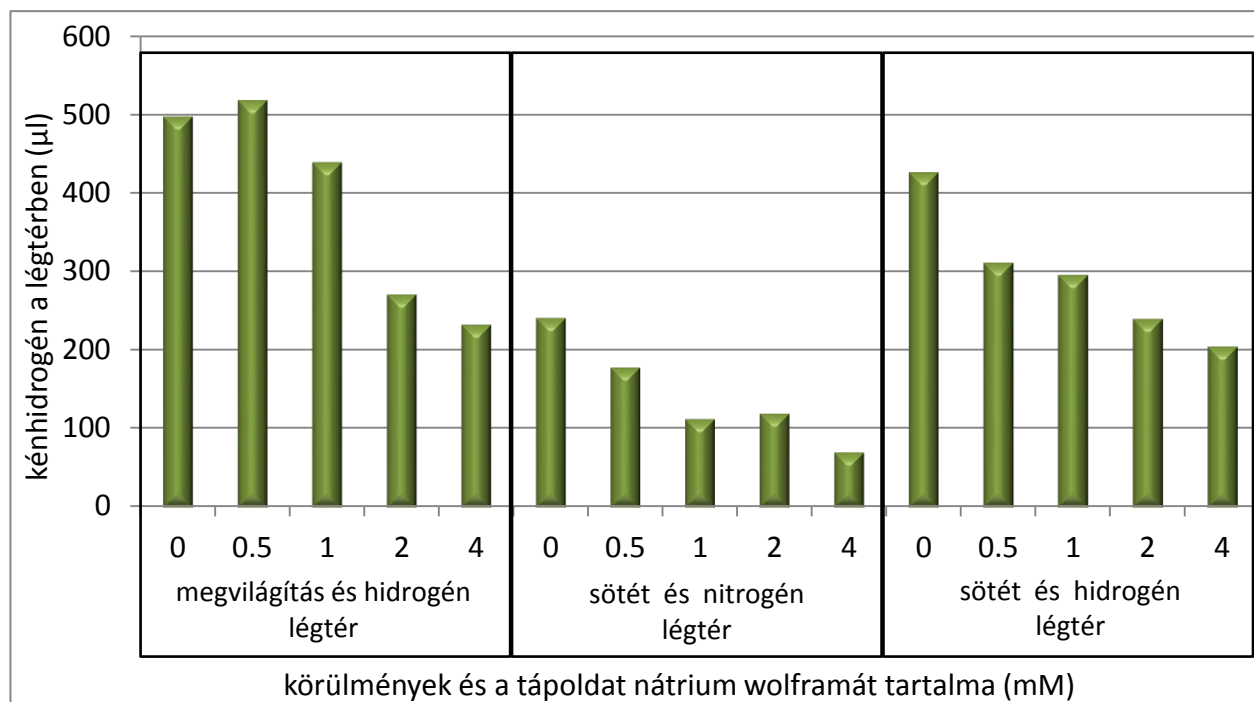
Mivel a fent említett eredményekből következhet, hogy a kénhidrogén- és hidrogéntermelés részben azonos elektrontranszport utat használ, megvizsgáltam, hogy a Hyn képes-e hidrogén jelenlétében meghajtani a kénhidrogén termelést. Ezt a vizsgálatot exogén elemi kén jelenlétében, nitrogén vagy hidrogén légtér alatt történő növesztéssel hajtottam végre.



19. ábra: GB2131 törzs kénhidrogén termelésének légtér összetételének függése

A hidrogén alkalmazása esetén nagymértékben növekedett a GB2131 törzs kénhidrogén termelése (19. ábra), tehát a hidrogenáz által felvett hidrogénből származó elektronokat a sejt kénhidrogén termelésre használhatja.

Amikor az elektrontranszport útvonal egyik terminálisán a hidrogenáz van, mi van a másik végén? Mint a kénanyagcserében szerepet játszó fehérjék génjeinek azonosításáról szóló fejezetben beszámoltam róla, a kénredukciót végző membránköötött fehérjét nem sikerült azonosítani egyértelműen. Ha egy molibdoprotein családba tartozó fehérje végzi a kénredukciót, akkor az enzim működését wolframát hozzáadása gátolja (Dahl és mtsai 2013).



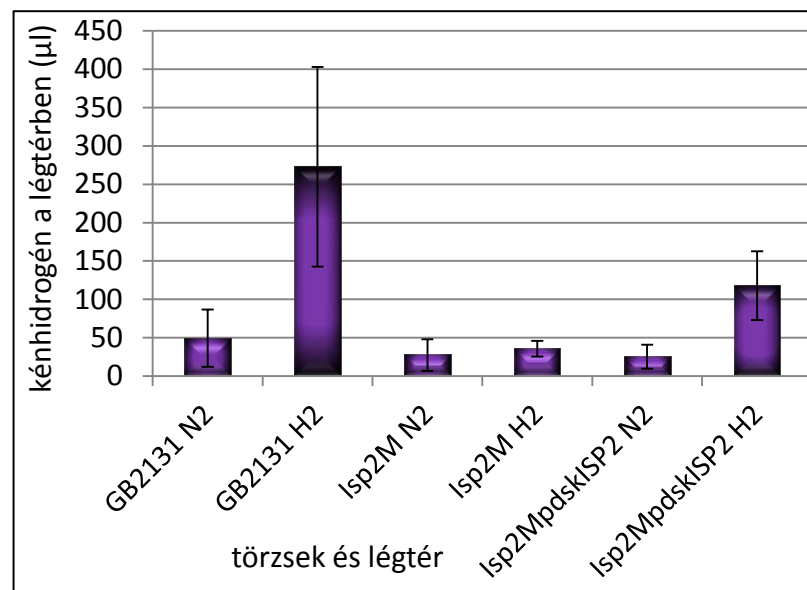
20. ábra: GB2131 törzs kénhidrogén termelésének változása a tápoldat nátrium-wolframát tartalmának függvényében

Ezért 12mM tioszulfát jelenlétében történő sejtszaporítás után a tápoldatot nátrium wolframáttal egészítettem ki és mértem a kénhidrogén termelést. A 20. ábrán látható, hogy a kénhidrogén termelését a wolframát fényen és sötétben egyaránt gátolta. Ebből valószínűsíthető, hogy a kénhidrogén termelésért legalább részben egy membránköötött molibdoenzim felel (20 ábra).

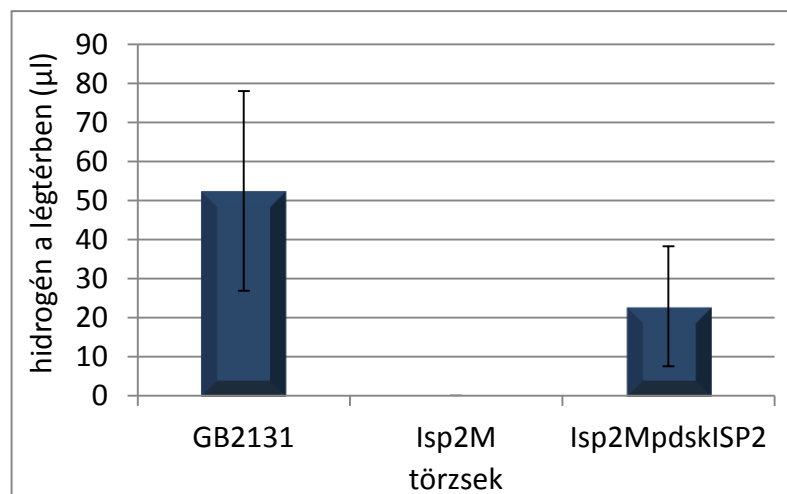
Kapcsolat a membrán elektrontranszport lánc és a Hyn hidrogenáz között

Az Isp2 szerepe a Hyn hidrogenáz elektrontranszportjában

A Hyn hidrogenáz egy periplazmatikus orientációjú membránkött hidrogenáz, mely két elektrontranszport alegységgel rendelkezik, az Isp1-gyel és Isp2-vel (Palágyi-Mészáros és mtsai, 2008). Felmerül a kérdés, hogy az elektronok milyen úton jutnak el az elektronakceptorokhoz? Hogy erre a kérdésre választ kapjak, a leolvasói keret megsértése nélküli mutagenézis segítségével Isp2-t nem tartalmazó törzset készítettem, majd követtem a törzs hidrogén és kénhidrogén termelését.



21. ábra: Az Isp2 szerepe a hidrogén és Hyn hidrogenáz-függő kénhidrogén termelésben

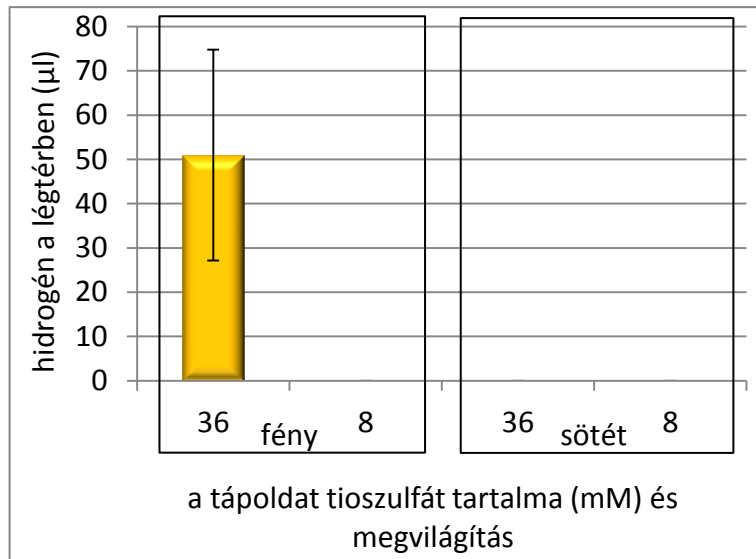


22. ábra: Isp2 szerepe a Hyn hidrogenáz *in vivo* hidrogéntermelésében

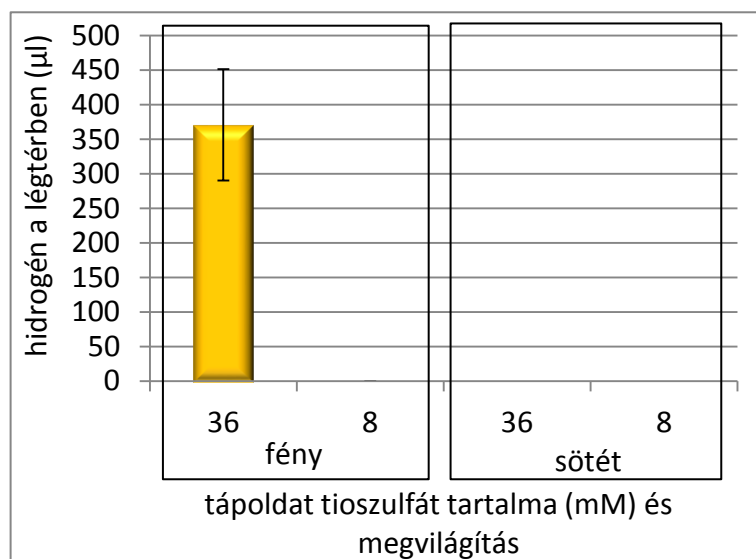
Isp2 hiányában egyaránt megszűnik a hidrogén-függő kénhidrogén termelés (21. ábra) és a hidrogéntermelés is (22. ábra). A mutáns fenotípust az *isp2* gént plazmidon tartalmazó vektor részben komplementálni képes, ami a mutagenézis sikerességét és specificitását támasztja alá (21, 22. ábra). A fentiek alapján, az Isp2 az egyik eleme a HynSL és a membrán redox rendszer közti elektrontranszport láncnak. Ha a Hyn hidrogenáz- és hidrogénfüggő kénredukciót preparált membrán frakción vizsgáljuk, akkor azt találjuk, hogy önmagában a membrán frakción nincs kénhidrogén termelés, csak ha azt kiegészítjük a szolúbilis frakcióval (az adatok nem képzik a dolgozat részét). Ez pedig azt sugallja, hogy a Hyn nem közvetlenül a kinonoknak adja tovább az elektronokat, hanem közvetve egy szolúbilis molekulán keresztül áll kapcsolatban a membrán redox rendszerrel.

A fotoszintetikus elektrontranszport szerepe a Hyn hidrogenáz hidrogéntermelésében

Annak megállapításához, hogy a membrán redox rendszer részéről mi tud elektronokat juttatni a Hyn hidrogenázhoz, tehát mi képes redukálni az ismeretlen szolúbilis molekulát, megvizsgáltuk a Hyn hidrogéntermelésének fényfüggését.



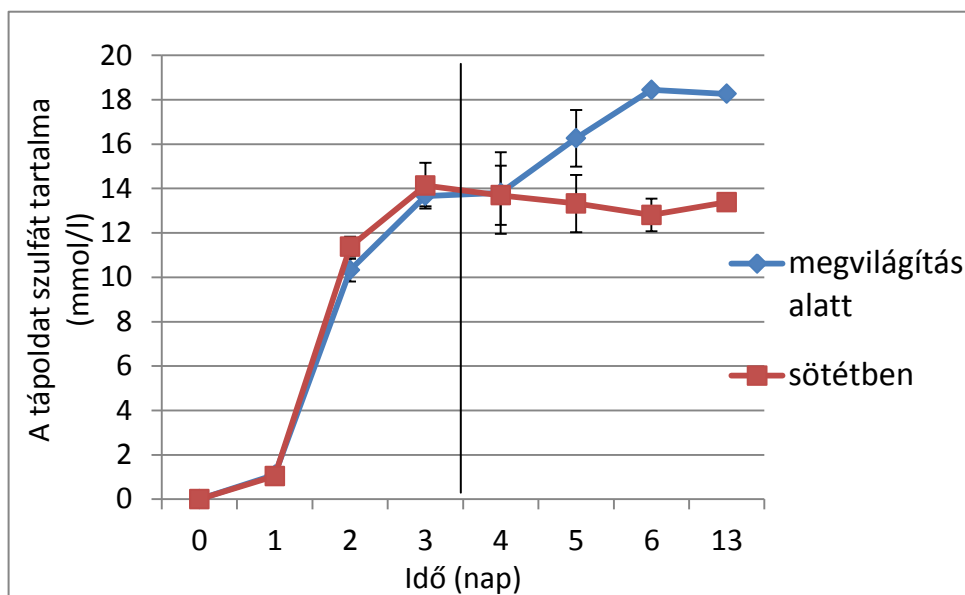
23. ábra: GB2131 törzs hidrogéntermelésének tioszulfát- és fényfüggése



24. ábra: THOE5M törzs hidrogéntermelésének tioszulfát- és fényfüggése

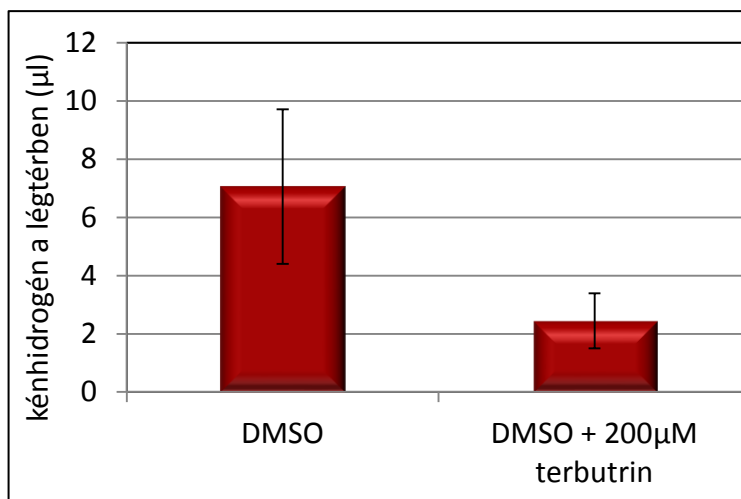
A Hyn csak megvilágítás alatt képes a hidrogéntermelésre és csak akkor, ha tioszulfát fölösleg van a tápoldatban (23. 24. ábra). Sötétben még hozzáadott piroszőlősav és borostyánkősav jelenlétében sem termel hidrogént (az adatok nincsenek feltüntetve). Ezen vegyületek képesek növelni a Hox1 hidrogenáz hidrogéntermelését, tehát a sejt számára elektronforrásként felhasználhatók, de a Hyn hidrogenáznak nem elektrondonorai.

A tioszulfát és a megvilágítás szoros kapcsolata pedig azért áll fenn, mert a tioszulfát asszimilációt és a raktározott elemi kén oxidációját végző Sox és Dsr enzimszisztéma a periplazmatikus citokrómokra adja az elektronokat, amik a fotoszintetikus reakciócentrum akceptor oldalára adják tovább azokat (Sander és mtsai, 2006; Grein és mtsai, 2010; Hensen és mtsai, 2006). Hogy valóban ez a jelenség áll a háttérben, ennek bizonyítására HPLC segítségével követtem a tioszulfát asszimiláció és a kénoxidáció során keletkező szulfátot.



25. ábra: GB2131 törzs szulfáttermelésének megvilágítás függése A sötétbe helyezés időpontját a fekete függőleges vonal jelzi.

Mivel sötétben nem termelődött sem hidrogén (23.,24. ábra) sem szulfát, (25. ábra), és a Hyn fent tárgyalt elektrondonorai mind a fotoszintetikus reakciócentrumba adják tovább elektronjaikat, megerősítést nyert, hogy a Hyn hidrogenáz és modellorganizmusunk fotoszintetikus elektrontranszport lánc között szoros a kapcsolat. Kérdés, hogy ebben a kapcsolatban a fotoszintetikus elektrontranszport lánc szerepe kétirányú-e? A kérdés megválaszolásához elektrontranszport gátlószereket vizsgáltam, amelyek közül a terbutrinnak (a Q_b hely specifikus kompetitív gátlószere) volt jelentős hatása a hidrogénfüggő kénhidrogén termelésre (26. ábra).



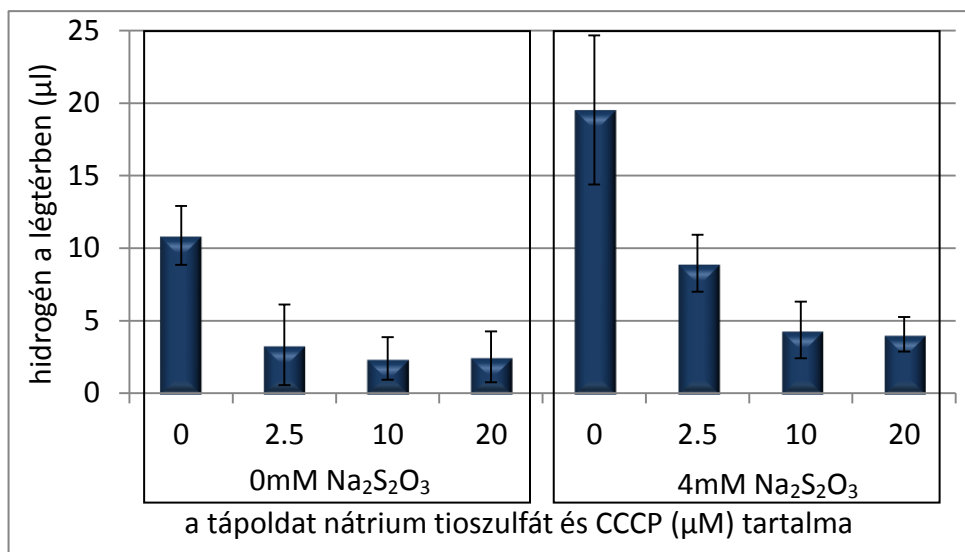
26. ábra: Terbutrin hatása a GB2131 törzs kénhidrogén termelésére hidrogén légtérben sötétben

Kontrollként a terbutrin oldószerét, DMSO-t tartalmazó mintát használtam.

A 26. ábra alapján a fotoszintetikus elektrontranszport láncnak a hidrogenáztól származó elektronok kinonraktárba, ezen keresztül pedig a kénredukcióhoz való vezetésben és a Hyn elektrondonorának redukálásában is egyaránt szerepe van (23, 24. ábra).

De annyi-e a fotoszintetikus elektrontranszport lánc szerepe a Hyn hidrogéntermelésében, hogy a fotoszintetikus reakciócentrum redukál egy redox mediátort, ami eljuttatja az elektronokat a Hyn hidrogenázra, vagy többtényezős elektrontranszport rendszerrel állunk szemben?

A kérdés megválaszolásához megvizsgáltam a Hyn hidrogéntermelését protonofor (CCCP) jelenlétében.

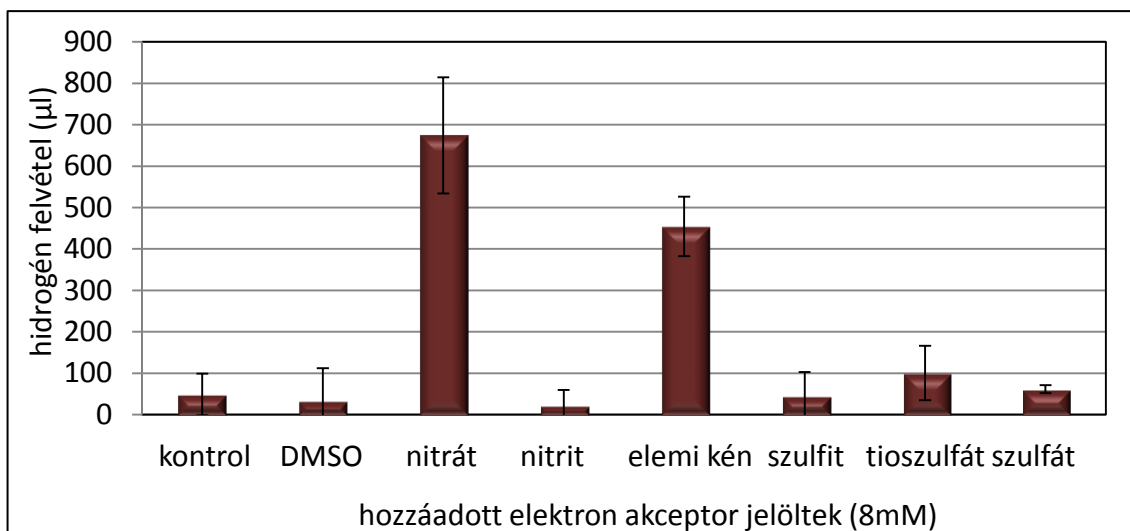


27. ábra: THOE5M törzs 1 napos hidrogéntermelésének CCCP és tioszulfát függése

A 27. ábrán az egynapos mérésből származó adatokat tüntettem fel. Ennek oka, hogy kísérleteim alapján, a CCCP elbomlik 1 nap után. Megállapítást nyert, hogy a Hyn hidrogenáz hidrogéntermelése drasztikusan lecsökken CCCP jelenlétében, tehát a protongrádiens hozzájárul a hidrogéntermeléshez. Mivel a protonofor nem szünteti meg teljesen a hidrogéntermelést még magasabb koncentrációknál sem (27. ábra), a Hyn elektrondonora képes a hidrogéntermelést meghajtani proton motoros erő (pmf) nélkül is.

A Hyn hidrogenáz terminális elektronakceptorai

Eddig ismertetett eredményeim minden ponton a kénanyagcseréhez köthetőek (kénfüggő hidrogéntermelés; kénredukció). Felmerül azonban az a kérdés, hogy egy általános ciklikus elektrontranszport - hidrogenáz kapcsolatról van szó, vagy specifikus kénanyagcsere - hidrogenáz kapcsolatról? Ezen kérdés megválaszolásához megvizsgáltam potenciális elektronakceptorok hatását a Hyn hidrogén felvételére. Amennyiben az elemi kénen kívül más, olyan elektronakceptor is megnöveli a hidrogén felvételt, ami a kinon raktárból kapja közvetlenül vagy közvetetten az elektronokat, akkor véglegesen igazolást nyert, hogy a Hyn a membrán redox rendszerébe adja az elektronokat.

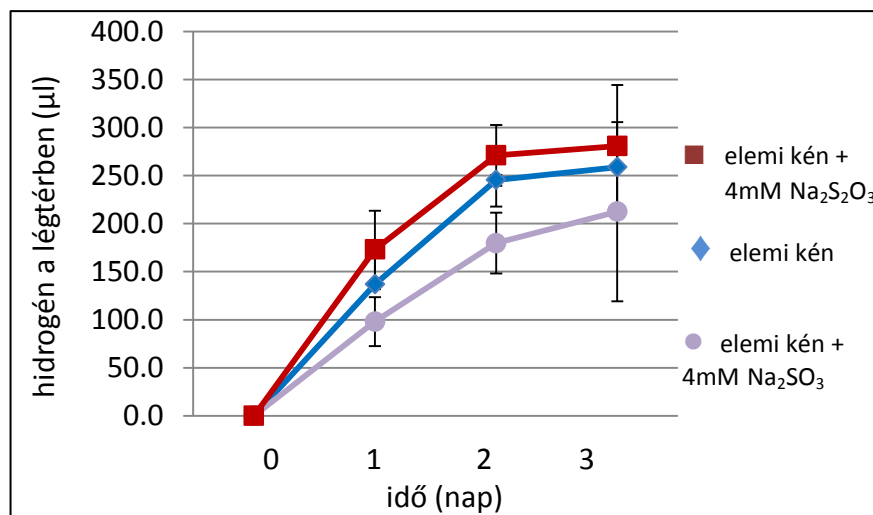


28. ábra: GB2131 törzs hidrogén felvételének változása sötétben különböző elektronakceptorok jelenlétében 3 nap alatt

Mint a 28. ábrán látható, a nitrát is megnöveli a hidrogén felvételt, nem csak a hozzáadott elemi kén. Továbbá a nitrát reduktázok típustól függően a kinon raktárból nyerik az elektronokat közvetlenül vagy periplazmatikus citokrómokon keresztül (Madigan és Martinko, 2006). Ezek alapján a Hyn közvetetten a kinon raktárba/membrán redox rendszerbe juttatja az elektronokat.

A Hox1 hidrogenáz kapcsolatai a kénanyagcserével

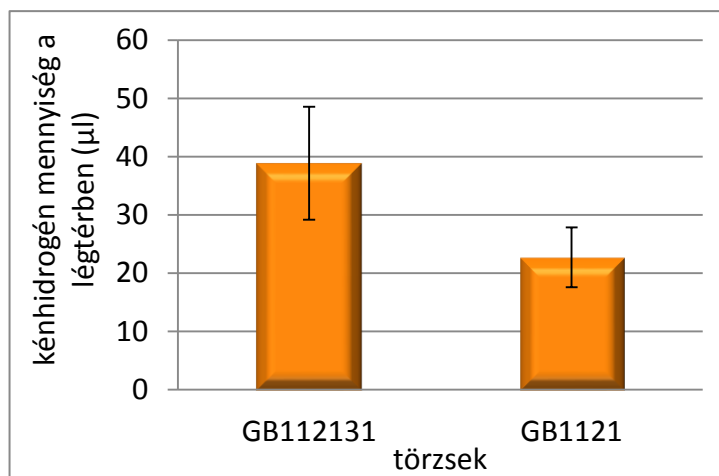
A munkám során feltérképeztem, hogy melyek a Hyn hidrogenáz elektrondonorjai, azok között van-e dominanciaviszony. Azt találtam, hogy a Hyn tioszulfátból és kénoxidációból nyeri az elektronokat. Felmerül a kérdés, hogy a másik hidrogéntermelő hidrogenáznak, a Hox1-nek mi a viszonya ezekhez a vegyületekhez, tud-e ezen vegyületek oxidációja során felszabaduló elektronokból hidrogént termelni? Van-e a két rendszert összekapcsoló, energetikailag kedvező elektrontranszport útvonal?



29. ábra: GB1121 törzs hidrogéntermelése megvilágítás alatt, endogén elemi kénen és más hozzáadott elektrondonorok jelenlétében

Hasonlóan a Hyn hidrogenázhoz, ezeket a kísérleteket is úgy végeztem, hogy a sejteket felneveltem vagy úgy, hogy tartalmazzanak kénglobulust vagy úgy, hogy ne tartalmazzanak. Majd külső elektrongazdag szubsztrát hozzáadásával vizsgáltam a Hox1 hidrogéntermelését. A Hox1 hidrogenáz is képes elemi kén hasznosításából hidrogént fejleszteni, de ellentétben a Hyn hidrogenázzal, az endogén elemi ként tartalmazó minták esetében a tioszulfát hozzáadása nem növelte tovább a hidrogéntermelést, tehát a Hox1 hidrogéntermelése a tioszulfátból keletkező elemi kén oxidációján keresztül zajlik le elsősorban. Másik érdekes kérdés, hogy csak a kénoxidáció, vagy a keletkező szulfid oxidációja is hozzájárulhat a hidrogéntermeléshez? A szulfid, ha kizárólagos elektrondonorként van jelen a tápoldatban a Hyn esetében nem, viszont Hox1 esetében elősegíti a hidrogéntermelést.

Összehasonlítottam a Hox1 hidrogenázt tartalmazó és nem tartalmazó (GB112131) törzsek kénhidrogén termelését, hogy pontosabb képet a kapjak a Hox1 szerepéről.



30. ábra: Hox1 hiányának hatása a *T. roseopersicina* kénhidrogén termelésére megvilágítás alatt

Azt találtam, hogy a Hox1 hiányában megnövekszik a kénhidrogén termelés (30. ábra). Ez a Hox1 hidrogenáz és a membrán redox rendszer, azon belül is a kinon raktár közti szoros kapcsolatot támasztja alá. Melyben a Hox1 feladata a membrán redox rendszer túlredukciója elleni védelem lehet, esetleg a túlzott kénhidrogén termelés megakadályozása.

Eredmények értékelése

Munkám során *in silico* analízissel összehasonlítottam a *T. roseopersicina* és az *A. vinosum* kénanyagcseréjében szerepet játszó géntermékeket. A nagyfokú hasonlóság mellett találtam különbségeket is. A Sox ciklus elemeit kódoló gének eleve szétszórtan helyezkednek el a modellorganizmusunk genomjában, ami eltér a *P. pantotrophus* esetében tapasztalttól, ahol azok egy operont alkotnak (Rother és mtsai, 2000). A Sox gének *A. vinosumban* pedig két operonba (*soxYZ* és *soxLAXB*) rendeződnek. Ezek a lókuszok modellorganizmusunkban is megtalálhatók, de a *soxXA* és *soxYZ* gének két példányban vannak jelen. Bár egy duplikáció/horizontális gén transzfer jelentős módosulás a genomban, ezek hatása a felállított biokémiai modellre valószínűleg elhanyagolható, mivel egyrészt nem tudjuk, hogy a gének átíródnak-e, másrészt a rendelkezésre álló információk alapján nincs okunk feltételezni, hogy a másodlagos Sox példányok más reakciót katalizálnának, mint a más Sox ciklusban leírt elemek. Ezek alapján az *A. vinosum* kénanyagcsere modellje (3. ábra) (Stockdreher és mtsai, 2012) alkalmazható modellorganizmusunkra.

Munkám során szisztematikusan megvizsgáltam a *Thiocapsa roseopersicina* Hyn és Hox1 hidrogenázainak hidrogéntermelését különböző kéntartalmú elektrondonorok jelenlétében, fotoautotróf körülmények között. A Hyn hidrogenáz hidrogéntermelése kizárólag elemi kén és tioszulfát jelenlétében valósul meg (12, 13. ábra). Abban az esetben, ha kizárólag szulfit volt a tápoldatban, a Hyn nem volt képes hidrogént termelni. A kénoxidáció és a tioszulfát asszimiláció közös pontja, hogy a fotoszintetikus elektrontranszport lánc szolúbilis citokróm c fehérjéjére továbbítják az elektronokat (Sander és mts, 2006; Hensen és mts., 2006). Ezzel szemben a szulfit oxidáció, amit a SoeABC/SAT és az AprMA enzimek katalizálnak (Dahl és mtsai 2013), közvetlenül a kinonraktárba adja az elektronokat.

A Hyn hidrogéntermelése szigorúan fényfüggő, (23, 24. ábra) tehát energiaigényes folyamat. A fényenergia egyrészt közvetlenül gerjesztett állapotú elektrontranszport molekulán vagy közvetetten pl. a proton motoros erőn keresztül csatolódhat be a hidrogéntermelésbe (27. ábra). A Hyn hidrogenáz hidrogéntermelése jelentősen csökkenthető a proton motoros erőt megszüntető uncouplerrel, de nem szüntethető meg teljesen (27. ábra). Bioenergetikai

szempontból szemlélve ugyanezt a jelenséget, megfelelő koncentrációviszonyok között a fiziológiás redoxpotenciál elég alacsony a protonredukcióhoz, de nagyjából a hidrogéntermelés protongrádiens felhasználásával történik. Ezek alapján a fotoszintetikus elektrontranszport láncnak a Hyn elektrondonorának redukciójában, illetve a ciklikus elektrontranszportnak az általa képzett protongrádiensen keresztül is fontos szerepe van a Hyn hidrogéntermelésében. Jelenleg a modellnek a protongrádiens szerepére vonatkozó része bizonytalan elemeket is tartalmaz, miszerint ismeretlen az elektrontranszportban résztvevő molekula, így azt egyelőre nem tudtuk kísérletileg tesztelni, hogy a protongrádiens mely ponton szolgáltatja a többletenergiát. Lehetséges, hogy proton-kapcsolt elektrontranszport segítségével redukálódik már az Isp2 vas-kén kockája. Az, hogy a protongrádiens hiányában is lezajlik - ha csökkent sebességgel is - a hidrogéntermelés, az valamilyen gerjesztett állapotú redox intermedierre utal. Feltételezhető az is, hogy az Isp2 mindenképpen redukálódik (mert az elektrondonor a fotoszintetikus reakciócentrumból egyszer már nyert energiát) és az Isp1 közreműködésével az elektronok kis alegységre való jutását gyorsítja meg a protonmotoros erő. Alternatív modellként az is lehetséges, hogy közvetlenül a Hyn elektrondonorának redukciójára hat a protongrádiens, egy ismeretlen mechanizmuson keresztül, ezért csökken a hidrogéntermelés CCCP jelenlétében (27. ábra).

A reakciócentrum Q_b helyén gátló kompetitív inhibitor, pl terbutrin jelenlétében csökkent a hidrogénfüggő kénhidrogén termelés (26. ábra), tehát a Hyn hidrogenáz elektrontranszport lánc mindkét irányban kapcsolatban van a fotoszintetikus elektrontranszport láncsal.

A Hyn hidrogéntermelésének és a kénhidrogén-termelés kapcsolatának vizsgálata során arra az eredményre jutottam, hogy kompetitív (18. ábra) folyamatok, de párhuzamosan lejátszódhatnak. Ha pusztán energetikailag szemléljük a kérdést, önmagában az is érdekes, hogy a két jelenség párhuzamosan megy végbe, mivel a kénredukció standard redoxpotenciálja - 210mV, a protonredukcióé -413mV (Madigan és Martinko 2006). Ez alapján a kénredukciónak kellene az egyedüli folyamatnak lennie. Mivel a kén globulusokat alkotó, illetve a kolloidális elemi kén vízben oldhatatlan és koncentrációja folyamatosan változik a kísérlet során, az adott

időpillanatban érvényes redox viszonyok nem számolhatóak pontosan, így nem állapítható meg, melyik a ténylegesen energetikailag kedvezőbb reakció.

A kénhidrogén termelés és a Hyn közti kapcsolatot tovább vizsgálva azt találtam, hogy Hyn és elemi kén jelenlétében a légtérbe adagolt hidrogén megnövelte a kultúra kénhidrogén termelését (19. ábra), tehát a Hyn hidrogenáz képes a felvett hidrogénből származó elektronokat a kénredukcióhoz juttatni. Ezt az aktivitást pedig wolframáttal gátolni lehet (20. ábra), ami egy molibdoprotein családba tartozó membránkött kénreduktáz szerepét valószínűsíti a kénhidrogén termelésben. Ezen fehérjék pedig a kinonraktárból kapják az elektronjaikat (Laska és mtsai 2003; Guiral és mtsai 2005). Kézenfekvő lenne a feltételezés, hogy az Isp1 az elektronmediátor, de egyrészt nem áll rendelkezésünkre megbízható információ arról, hogy az Isp1-en lennének-e kinon kötő helyek, és Isp2 hiányában nincs Hyn függő hidrogéntermelés és hidrogénfelvétel.

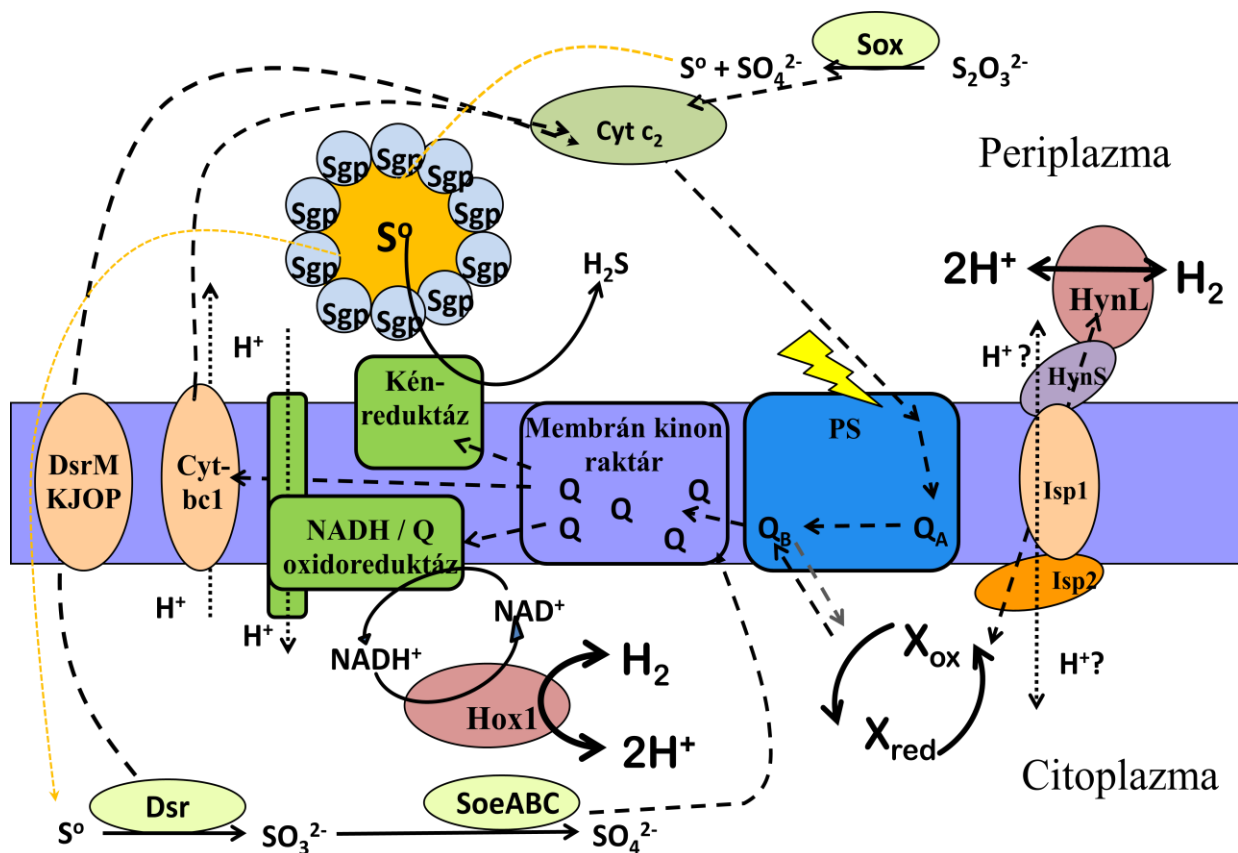
Ennek tisztázására az Isp2 fehérje génjét *in frame* mutagenézissel eltávolítottam. A membrán-asszociált citoplazmatikus orientációjú Isp2 hiányában a Hyn katalizálta hidrogéntermelés és a hidrogénfüggő kénhidrogén termelés egyaránt megszűnik (21, 22. ábra). Megfigyeltem, hogy a Hyn- és hidrogénfüggő kénhidrogén termelés önmagában membránfrakción nem működik. Ezek alapján egy szolúbilis elektrontranszport molekula lehet az elektronhordozó, ami elektronokat juttat a Hyn enzimtől a membrán redox rendszerbe és vissza. Az általam jellemzett membránkött hidrogenáz-kénreduktáz rendszerhez elemeiben leginkább az *A. ambivalens*-ben leírt komplex hasonló, mely szerint a HynSL által felvett hidrogénből származó elektronok az Isp1 segítségével redukálják az elektron mediátor kinonokat, amik a kénreduktázra juttatják az elektronokat. (Laska és mtsai, 2003).

A Hyn hidrogéntermelése kénvegyületekkel áll kapcsolatban, emellett a hidrogénfelvétel növeli a kénhidrogén termelést. Az ezekből adódó feltételezést, miszerint egy kizárólagos kénanyagcsere–Hyn hidrogenáz kapcsolat van, alátámasztana az is, hogy az Isp2 a heterodiszulfid reduktáz D típusú fehérjéhez és a kénoxidációban szerepet játszó DsrK-hoz mutat hasonlóságot (Rákhely és mts. 1998). Továbbá, a *Chromatiaceae*-ben ismert heterodiszulfid típusú molekulának, a glutation-amidnak (Bartsch és mtsai, 1996) a jelenlétét

modellorganizmusunkban HPLC-FLD vizsgálattal alátámasztottam (az adatok nincsenek feltűntetve). Ezek mellett *Aquifex aeolicus*-ban a Hyn és a kénreduktáz között enzim-enzim interakció van (Guiral és mtsai, 2005). Viszont *T. roseopersicina*-ban nemcsak a hozzáadott elemi kén, hanem a nitrát is képes megnövelni a Hyn hidrogénfelvételét (28. ábra), tehát nem egy kénanyagcsere specifikus, hanem egy általános hidrogenáz - membrán elektrontranszport lánc kapcsolatról beszélhetünk.

Ez a modell a következőképpen írható le: a kénoxidáció és tioszulfát asszimiláció során felszabaduló elektronok a periplazmatikus citokróm molekulákon keresztül fényenergia segítségével jutnak a fotoszintetikus elektrontranszport láncba, majd a Q_b helyről kilépve egy redox molekulára kerülnek. Ez a redox aktív molekula juttatja az elektronokat a Hyn Isp2 alegységére, innen az elektronok a katalitikus alegységekre jutnak, ahol a protonokkal rekombinálódva H_2 képződik (31. ábra). Hidrogénfelvétel esetén az első lépésben redukálódik az elektronhordozó molekula, ami továbbadja az elektront a fotoszintetikus reakciócentrum Q_b helyén keresztül majd onnan az elektron kénredukcióra vagy nitrátredukcióra fordítódik (35. ábra).

Ezzel szemben a Hox1 hidrogenáz hidrogéntermelésének legfőbb elektrondonora az elemi kén (29. ábra). Ezen kívül a szulfit oxidációja is indukál hidrogéntermelést. A szulfit szulfáttá történő oxidációját a SoeABC/ SAT és az AprMA enzimek katalizálják. Ezen redox reakciók a kinon raktárral állnak kapcsolatban (Dahl és mtsai 2013). A fentiekből következik, hogy a Hox1 a működéséhez szükséges elektronokat a kinon raktárból nyeri (35. ábra), amit alátámaszt, hogy hiányában megnövekszik a kénhidrogén termelés (30. ábra). Figyelembe véve, hogy a Hox1 elemi kén jelenlétében termeli a legtöbb hidrogént, valószínű, hogy a Hox1 funkciója a sejtek védelme a membrán redox rendszer túlredukciója ellen (31. ábra). A fenti eredmények összhangban vannak a Hox1 hidrogenázról rendelkezésre álló irodalmi adatokkal, miszerint a Hox1 hidrogenáz a NAD^+ -redukáló hidrogenázok közé tartozik (Rákhely és mtsai 2004) és bíbor kénbaktériumokban a NAD^+ redukciója a kinon raktárhoz és protonmotoros erő felhasználáshoz kötött (Madigan és Martinko, 2009).



31. ábra: *Thiocapsa roseopersicina* BBS hidrogenázai és azokhoz kapcsolódó anyagcsere útvonalak
 pöttyözött vonal: protontranszlokáció; Szaggatott vastag vonal: elektrontranszport; vékony sárga szaggatott vonal: kéntranszport; nem szaggatott vonal: redox átmenet.

Összefoglalás

Napjaink egyik legfontosabb feladata a megújuló energiaforrásokból származó környezetbarát energiahordozókra való áttérés. Ezen kihívásnak felelhet meg a biohidrogén, ami előállítható foto- és sötétfermentációval hidrogenáz vagy nitrogenáz enzimek segítségével. A nitrogenáz alapú hidrogéntermelés nagy előnye, hogy a hidrogén részéről termékgátlás nem alakul ki. A legideálisabb megoldás azonban a hidrogén fotoautotróf körülmények közti előállítása. Jelenleg tudományos szempontból a legnépszerűbb megközelítés a kétlépéses alga alapú hidrogéntermelés, aminek hátránya, hogy az intenzív hidrogéntermeléshez acetátot is igényel a mikroba, illetve hosszútávon fenntartható módszer még nem ismeretes. Ezzel szemben modellorganizmusunk, a *Thiocapsa roseopersicina* BBS, ami egy fototróf bíbor kénbaktérium, képes kizárólag szervesetlen anyagokat felhasználva hidrogenáz és nitrogenáz enzimek segítségével hidrogéntermelésre.

A fototróf bíbor kénbaktériumok nevüket onnan kapták, hogy anaerob fotoszintézisükhöz elektrondonorként leginkább kénvegyületeket használnak. A tioszulfát asszimilációja és a kén oxidációja során felszabaduló elektronokat megvilágítás hatására a fotoszintetikus reakciócentrumba adják, ahol azok energiát nyerve az RC Q_b helyén keresztül a kinon raktárba kerülnek. Ezzel szemben a szulfid oxidációja közvetlenül a kinon raktárba juttatja az elektronokat. Innen protonmotoros erő felhasználásával NAD⁺ redukcióra fordítható vagy citokróm bc₁ komplex segítségével periplazmatikus citokróмокat redukálnak, miközben protongradiens képzés történik. *Thiocapsa roseopersicina* BBS-ben négy aktív [NiFe]-hidrogenáz van, ezek közül kettő membrán asszociált: a Hyn és a kizárólag hidrogén felvételi irányban működő Hup. A másik kettő citoplazmatikus NAD⁺ redukáló enzim: a Hox1 és a Hox2. Ezen kívül modellorganizmusunk képes a hidrogéntermelésre nitrogenáz enzimek segítségével is.

Munkám során az volt a célom, hogy megvizsgáljam a fotoszintetikus elektrontranszportlánc elemei és a Hyn és Hox1 hidrogenázok közti kapcsolatot, részletes modellt állítsak föl a kapott eredmények alapján.

A Hyn hidrogenáz egy figyelemreméltó stabilitással rendelkező kétirányú hidrogenáz, aminek van két elektrontranszfer alegysége, a transzmembrán Isp1 és membrán asszociált citoplazmatikus orientációjú Isp2. A Hyn hidrogenáz hidrogéntermelése kizárólag elemi kén és tioszulfát jelenlétében valósul meg. HynL-specifikus Western analízis segítségével kimutattam, hogy a GB2131 és THOE5M törzsek közti hidrogéntermelésbeli különbségért a sejtekben található eltérő mennyiségű hidrogenáz felel, míg a tápoldat tioszulfát tartalmának függvényében a törzsek hidrogenáz tartalma nem változott. Ez alapján a két kénvegyület a megnövelt elektronfluxuson keresztül képes a hidrogéntermelés növelésére. A tioszulfát asszimiláció és a kénoxidáció a fotoszintetikus reakciócentrum akceptor oldalára juttatják az elektronjaikat, így megvilágítás alatt képesek redukáló erőt biztosítani a Hyn hidrogéntermeléséhez. Ezzel szemben a szulfid oxidáció, mely a kinon raktárral áll kapcsolatban, nem képes elektronokat biztosítani a Hyn számára. A két hidrogéntermelést serkentő útvonal közül úgy tűnik, hogy - a Hyn esetén - a tioszulfát asszimiláció a jobb elektrondonor. A Hyn hidrogenáz hidrogéntermelése fényfüggő, a Hyn elektrondonora a fotoszintetikus elektrontranszport láncsal áll kétirányú kapcsolatban. Ezt a Hyn és hidrogénfüggő kénhidrogén termelés terbutrinnal történő gátlásával erősítettem meg. A fotoszintetikus elektrontranszport láncnak van egy másik szerepe is a Hyn hidrogéntermelésében. Ez a protongrádiens előállítása, aminek CCCP-vel való eliminálása esetén csökken, de nem szűnik meg a Hyn hidrogéntermelése. Leolvasási keret elrontása nélküli mutagenézissel elkészítettem a Hyn Isp2 alegységét nem tartalmazó törzset. Ennek hiányában megszűnt a hidrogéntermelés és a hidrogénfüggő kénhidrogén termelés egyaránt, tehát az Isp2 része a Hyn elektrontranszport láncának. Különböző elektronakceptor jelöltek vizsgálata során azt az eredményt kaptuk, hogy nemcsak az elemi kén képes a Hyn függő hidrogénfelvétel gyorsítására, hanem a nitrát is. Kijelenthetjük, hogy a Hyn nem specifikusan a kénanyagcseréhez, hanem a membrán elektrontranszport lánchoz kötött, és olyan elektronakceptorok redukciójára képes, amik közvetve vagy közvetlenül a kinon raktárból nyernek elektronokat, így a Hyn működése a kinon raktár redox állapotának függvénye.

A Hox1 hidrogenáz egy heteropentamer szerkezetű hidrogenáz, melynek hidrogéntermelése fotoszintetikus körülmények között elemi kén oxidációhoz illetve a

kinonokat redukáló szulfitoxidációhoz kapcsoltn megy végbe. Ez teljesen összhangban van a rendelkezésünkre álló irodalmi adatokkal, miszerint a Hox1 hidrogéntermelése kapcsolható a NADH-hoz, a NAD^+ redukciója pedig a kinon raktárhoz kötött és protonmotoros erőt használ fel, amit a fotoszintetikus ciklikus elektrontranszport állít elő (Madigan és Martinko, 2009). A kinon raktárhoz való kapcsoltságát alátámasztja az is, hogy a Hox1 hidrogéntermelése és a kénhidrogén termelés kompetitív folyamatok, ami alapján a membrán redox rendszer túlredukciója elleni védelem lehet a Hox1 feladata.

Summary

The main challenge of mankind nowadays is to replace fossil fuels with renewable ones. Biohydrogen can satisfy the criteria of this challenge. It could be produced via dark fermentation with hydrogenase enzymes or via photofermentation from volatile fatty acids with active nitrogenase containing purple non-sulfur bacteria. The advantage of the nitrogenase based biohydrogen production is the lack of product inhibition during increasing hydrogen concentration. The ideal approach for biohydrogen production would be the use of photoautotrophic conditions during fermentation. Certain algae could do this, but with some drawbacks, such as acetate is necessary in the media, and this method requires two steps (cultivation, and hydrogen production). In contrast to this, our model organism, the phototrophic sulfur bacterium *Thiocapsa roseopersicina* BBS is able to produce hydrogen from inorganic materials with its hydrogenases and nitrogenase.

Phototrophic sulfur bacteria use sulfur compounds as electron donors for their anaerobic photosynthesis. Assimilation of thiosulfate and oxidation of sulfur donate electrons to the photosynthetic reaction center, where the electrons get energy from sunlight and reach the quinone pool via the Q_b site of the reaction center, while sulfite oxidation donates electrons directly to the quinone pool. The quinone pool could reduce NAD^+ with the utilization of the proton motive force or could reduce periplasmic cytochromes via cytochrome bc1 during proton gradient formation. The final step of the cyclic electron transport chain is the reduction of RC via cytochromes.

Thiocapsa roseopersicina BBS has four active [NiFe]-hydrogenases. Two of them are associated to the membrane: the bidirectional Hyn and the uptake only Hup. The other two hydrogenases are the heteropentameric Hox1 and the heterotetrameric Hox2; these enzymes belong to the group of cytoplasmic NAD^+ reducing hydrogenases.

The main goal of my project was to find the connection between sulfur metabolism, the photosynthetic electron transport chain and the Hyn and Hox1 hydrogenases. I tested the effect of various electron donors and acceptors, in the hydrogen evolution and uptake of strains

containing one hydrogenase. Based on results a model was built, which describes the mechanism of the connection. Finally I verified the model with molecular approaches.

A Hyn hydrogenase is a bidirectional enzyme with unique stability; it has two electron transport subunits: *isp1*, which is a transmembrane protein with a b-type heme binding site. *Isp2* seems to be a membrane associated protein with a cytoplasmic orientation. The hydrogen production of Hyn is only working in the presence of thiosulfate and elemental sulfur. Using HynL specific Western analysis, I clarified the difference between the hydrogen evolution of GB2131 and THOE5M strains. This difference was caused by the different amount of hydrogenase in the cells, whereas the thiosulfate dependent increase in the hydrogen evolution resulted from the increased electron flux.

Thiosulfate assimilation and sulfur oxidation donates electrons to the photosynthetic reaction center, therefore they could intensify the hydrogen evolution in parallel. In contrast to this, sulfite oxidation, which donates electrons to the quinone pool, is not able to enhance the hydrogen evolution of Hyn as a sole electron donor. If we compare the two pathways which stimulate the hydrogen production, it looks like that thiosulfate assimilation is the better one. Based on the illumination dependence of the hydrogen evolution, the electron donor of Hyn is reduced by the photosynthetic reaction center. The importance of the RC in the electron transport pathway of Hyn was confirmed by the inhibition of the hydrogen driven hydrogen sulfide formation using a Q_b site competitive inhibitor: terbutryn. If we eliminate the proton gradient with the addition of CCCP, the hydrogen production drops to 20%. Therefore, the photosynthetic electron transport chain has another role in the hydrogen production, because it is responsible for the proton gradient formation.

We constructed a strain lacking *isp2*. In the absence of *Isp2* we could not detect any hydrogen evolution and hydrogen linked hydrogen sulfide formation, so *Isp2* has an indispensable role in the electron transport chain of Hyn. During the examination of the effect of different kinds of electron acceptors, it was found that not only the sulfur increased the hydrogen uptake, nitrate also had the same effect. According to these results Hyn is also connected to the membrane electron transport, not only to the sulfur oxidation/reduction. Hyn

could donate electrons to the reduction of electron acceptors, which could get electrons from the quinone pool; therefore the reduction state of the quinone pool affected the behavior of Hyn.

Hydrogen evolution of Hox1 is driven by thiosulfate assimilation, elemental sulfur oxidation, and sulfite oxidation under phototrophic conditions. All of these pathways deliver electrons directly or indirectly to the quinone pool. In case of the Hox1 containing strain, additional thiosulfate could not increase the hydrogen evolution, compared to the hydrogen evolution in the presence of elemental sulfur as a sole electron donor. These findings are in fully agreement with previous data, because hydrogen evolution by Hox1 is connected to NADH, which is generated via the quinone pool, with the consumption of the proton gradient, which, in turn, is generated by the cyclic electron flow. The connection of Hox1 to the quinone pool is supported by the fact that the hydrogen evolution by Hox1 is competitive against the sulfur reduction. Based on these observations the physiological role of Hox1 could be decreasing the over reduction of the membrane redox system, and to prevent the cell from excessive hydrogen sulfide production.

Hivatkozások jegyzéke

- Aubert-Jousset, E., Cano, M., Guedeney, G., Richaud, P., és Cournac, L. (2011). Role of HoxE subunit in *Synechocystis* PCC6803 hydrogenase. *FEBS Journal*, 278(21), 4035–4043. doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08308.x
- Bagyinka, C., Kovacs, K. L., és Rak, E. (1982). Localization of hydrogenase in *Thiocapsa roseopersicina* photosynthetic membrane. *Biochemical Journal*, 202(1), 255–258.
- Bartsch, R. G., Newton, G. L., Sherrill, C., és Fahey, R. C. (1996). Glutathione amide and its perthiol in anaerobic sulfur bacteria. *Journal of Bacteriology*, 178(15), 4742–4746.
- Benemann, J. (1996). Hydrogen biotechnology: Progress and prospects. *Nature Biotechnology*, 14(9), 1101–1103. doi:10.1038/nbt0996-1101
- Bogorov, L. V. (1974). [The properties of *Thiocapsa roseopersicina*, strain BBS, isolated from an estuary of the White Sea]. *Mikrobiologijia*, 43(2), 326–332.
- Brandt, A. R., Englander, J., és Bharadwaj, S. (2013). The energy efficiency of oil sands extraction: Energy return ratios from 1970 to 2010. *Energy*, 55, 693–702. doi:10.1016/j.energy.2013.03.080
- Burgdorf, T., Linden, E. van der, Bernhard, M., Yin, Q. Y., Back, J. W., Hartog, A. F., ... Friedrich, B. (2005). The Soluble NAD⁺-Reducing [NiFe]-Hydrogenase from *Ralstonia eutropha* H16 Consists of Six Subunits and Can Be Specifically Activated by NADPH. *Journal of Bacteriology*, 187(9), 3122–3132. doi:10.1128/JB.187.9.3122-3132.2005
- Chu, S., és Majumdar, A. (2012). Opportunities and challenges for a sustainable energy future. *Nature*, 488(7411), 294–303. doi:10.1038/nature11475
- Cort, J. R., Selan, U., Schulte, A., Grimm, F., Kennedy, M. A., és Dahl, C. (2008). *Allochromatium vinosum* DsrC: solution-state NMR structure, redox properties, and interaction with DsrEFH, a protein essential for purple sulfur bacterial sulfur oxidation. *Journal of Molecular Biology*, 382(3), 692–707. doi:10.1016/j.jmb.2008.07.022
- Dahl, C., Engels, S., Pott-Sperling, A. S., Schulte, A., Sander, J., Lubbe, Y., ... Brune, D. C. (2005). Novel Genes of the dsr Gene Cluster and Evidence for Close Interaction of Dsr Proteins during Sulfur Oxidation in the Phototrophic Sulfur Bacterium *Allochromatium vinosum*. *Journal of Bacteriology*, 187(4), 1392–1404. doi:10.1128/JB.187.4.1392-1404.2005
- Dahl, C., Franz, B., Hensen, D., Kesselheim, A., és Zigann, R. (2013). Sulfite oxidation in the purple sulfur bacterium *Allochromatium vinosum*: identification of SoeABC as a major player and relevance of SoxYZ in the process. *Microbiology (Reading, England)*, 159(Pt 12), 2626–2638. doi:10.1099/mic.0.071019-0
- Dahl, C., Rákhely, G., Pott-Sperling, A. s., Fodor, B., Takács, M., Tóth, A., ... Kovács, K. L. (1999). Genes involved in hydrogen and sulfur metabolism in phototrophic sulfur bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 180(2), 317–324. doi:10.1111/j.1574-6968.1999.tb08812.x
- Dementin, S., Burlat, B., Lacey, A. L. D., Pardo, A., Adryanczyk-Perrier, G., Guigliarelli, B., ... Rousset, M. (2004). A Glutamate Is the Essential Proton Transfer Gate during the Catalytic Cycle

of the [NiFe]-Hydrogenase. *Journal of Biological Chemistry*, 279(11), 10508–10513. doi:10.1074/jbc.M312716200

Denkman, K., Grein, F., Zigann, R., Siemen, A., Bergmann, J., van Helmont, S., ... Dahl, C. (2012). Thiosulfate dehydrogenase: a widespread unusual acidophilic c-type cytochrome. *Environmental Microbiology*, 14(10), 2673–2688. doi:10.1111/j.1462-2920.2012.02820.x

Dietrich, W., és Klimmek, O. (2002). The function of methyl-menaquinone-6 and polysulfide reductase membrane anchor (PsrC) in polysulfide respiration of *Wolinella succinogenes*. *European Journal of Biochemistry*, 269(4), 1086–1095. doi:10.1046/j.0014-2956.2001.02662.x

Fodor, B., Rákhely, G., Kovács AT, és Kovács, K. L. (2001). Transposon mutagenesis in purple sulfur photosynthetic bacteria: identification of hypF, encoding a protein capable of processing [NiFe]-hydrogenases in alpha, beta, and gamma subdivisions of the proteobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(6), 2476–2483. doi:10.1128/AEM.67.6.2476-2483.2001

Franz, B., Lichtenberg, H., Hormes, J., Modrow, H., Dahl, C., és Prange, A. (2007). Utilization of solid “elemental” sulfur by the phototrophic purple sulfur bacterium *Allochrochromatium vinosum*: a sulfur K-edge X-ray absorption spectroscopy study. *Microbiology (Reading, England)*, 153(Pt 4), 1268–1274. doi:10.1099/mic.0.2006/003954-0

Grein, F., Venceslau, S. S., Schneider, L., Hildebrandt, P., Todorovic, S., Pereira, I. A. C., és Dahl, C. (2010). DsrJ, an essential part of the DsrMKJOP transmembrane complex in the purple sulfur bacterium *Allochrochromatium vinosum*, is an unusual triheme cytochrome c. *Biochemistry*, 49(38), 8290–8299. doi:10.1021/bi1007673

Grimm, F., Cort, J. R., és Dahl, C. (2010). DsrR, a Novel IscA-Like Protein Lacking Iron- and Fe-S-Binding Functions, Involved in the Regulation of Sulfur Oxidation in *Allochrochromatium vinosum*. *Journal of Bacteriology*, 192(6), 1652–1661. doi:10.1128/JB.01269-09

Grimm, F., Franz, B., és Dahl, C. (2011). Regulation of Dissimilatory Sulfur Oxidation in the Purple Sulfur Bacterium *Allochrochromatium vinosum*. *Frontiers in Microbiology*, 2. doi:10.3389/fmicb.2011.00051

Guiral, M., Tron, P., Aubert, C., Gloter, A., Iobbi-Nivol, C., és Giudici-Orticoni, M.-T. (2005). A membrane-bound multienzyme, hydrogen-oxidizing, and sulfur-reducing complex from the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(51), 42004–42015. doi:10.1074/jbc.M508034200

Gutekunst, K., Chen, X., Schreiber, K., Kaspar, U., Makam, S., és Appel, J. (2014). The Bidirectional NiFe-hydrogenase in *Synechocystis sp.* PCC 6803 Is Reduced by Flavodoxin and Ferredoxin and Is Essential under Mixotrophic, Nitrate-limiting Conditions. *Journal of Biological Chemistry*, 289(4), 1930–1937. doi:10.1074/jbc.M113.526376

Hallenbeck, P. C., és Ghosh, D. (2012). Improvements in fermentative biological hydrogen production through metabolic engineering. *Journal of Environmental Management*, 95, Supplement, S360–S364. doi:10.1016/j.jenvman.2010.07.021

- Hensen, D., Sperling, D., Trüper, H. G., Brune, D. C., és Dahl, C. (2006). Thiosulphate oxidation in the phototrophic sulphur bacterium *Allochromatium vinosum*. *Molecular Microbiology*, 62(3), 794–810. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05408.x
- Herrero, M., de Lorenzo, V., és Timmis, K. N. (1990). Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *Journal of Bacteriology*, 172(11), 6557–6567.
- Hunter, C. N. (2008). *The Purple Phototrophic Bacteria*. Springer.
- Inoue, H., Nojima, H., és Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 96(1), 23–28. doi:10.1016/0378-1119(90)90336-P
- Kanan, M. W., és Nocera, D. G. (2008). In Situ Formation of an Oxygen-Evolving Catalyst in Neutral Water Containing Phosphate and Co^{2+} . *Science*, 321(5892), 1072–1075. doi:10.1126/science.1162018
- Kappler, U., és Dahl, C. (2001). Enzymology and molecular biology of prokaryotic sulfite oxidation1. *FEMS Microbiology Letters*, 203(1), 1–9. doi:10.1111/j.1574-6968.2001.tb10813.x
- Keen, N. T., Tamaki, S., Kobayashi, D., és Trollinger, D. (1988). Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in Gram-negative bacteria. *Gene*, 70(1), 191–197. doi:10.1016/0378-1119(88)90117-5
- Keskin, T., és Hallenbeck, P. C. (2012). Hydrogen production from sugar industry wastes using single-stage photofermentation. *Bioresource Technology*, 112, 131–136. doi:10.1016/j.biortech.2012.02.077
- Kovács, K. L., Kovács, A. T., Maróti, G., Mészáros, L. S., Balogh, J., Latinovics, D., ... Rákhely, G. (2005). The hydrogenases of *Thiocapsa roseopersicina*. *Biochemical Society Transactions*, 33(Pt 1), 61–63. doi:10.1042/BST0330061
- Laska, S., Lottspeich, F., és Kletzin, A. (2003). Membrane-bound hydrogenase and sulfur reductase of the hyperthermophilic and acidophilic archaeon *Acidianus ambivalens*. *Microbiology (Reading, England)*, 149(Pt 9), 2357–2371.
- Laurinavichene, T. V., Rákhely, G., Kovács, K. L., és Tsygankov, A. A. (2007). The effect of sulfur compounds on H_2 evolution/consumption reactions, mediated by various hydrogenases, in the purple sulfur bacterium, *Thiocapsa roseopersicina*. *Archives of Microbiology*, 188(4), 403–410. doi:10.1007/s00203-007-0260-7
- Le Faou, A., Rajagopal, B. S., Daniels, L., és Fauque, G. (1990). Thiosulfate, polythionates and elemental sulfur assimilation and reduction in the bacterial world. *FEMS Microbiology Letters*, 75(4), 351–382. doi:10.1016/0378-1097(90)90688-M
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., és RANDALL, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–275.
- Lübbe, Y. J., Youn, H.-S., Timkovich, R., és Dahl, C. (2006). Siro(haem)amide in *Allochromatium vinosum* and relevance of DsrL and DsrN, a homolog of cobyrinic acid a,c-diamide synthase, for sulphur oxidation. *FEMS Microbiology Letters*, 261(2), 194–202. doi:10.1111/j.1574-6968.2006.00343.x

Madigan, M. T., és Martinko, J. M. (2006). *Brock Biology of Microorganisms*. Pearson Prentice Hall.

Maróti, J., Farkas, A., Nagy, I. K., Maróti, G., Kondorosi, E., Rákhely, G., és Kovács, K. L. (2010). A second soluble Hox-type NiFe enzyme completes the hydrogenase set in *Thiocapsa roseopersicina* BBS. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(15), 5113–5123. doi:10.1128/AEM.00351-10

Melis, A., és Happe, T. (2001). Hydrogen Production. Green Algae as a Source of Energy. *Plant Physiology*, 127(3), 740–748. doi:10.1104/pp.010498

Morais-Silva, F. O., Santos, C. I., Rodrigues, R., Pereira, I. A. C., és Rodrigues-Pousada, C. (2013). Roles of HynAB and Ech, the Only Two Hydrogenases Found in the Model Sulfate Reducer *Desulfovibrio gigas*. *Journal of Bacteriology*, 195(20), 4753–4760. doi:10.1128/JB.00411-13

Nyilasi, A., Molnos, É., Lányi, S., Nagy, I., Rákhely, G., és Kovács, K. L. (2013). Photofermentative production of hydrogen from organic acids by the purple sulfur bacterium *Thiocapsa roseopersicina*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(14), 5535–5544. doi:10.1016/j.ijhydene.2013.02.084

Palágyi-Mészáros, L. S., Maróti, J., Latinovics, D., Balogh, T., Klement, E., Medzihradszky, K. F., ... Kovács, K. L. (2009). Electron-transfer subunits of the NiFe hydrogenases in *Thiocapsa roseopersicina* BBS. *The FEBS Journal*, 276(1), 164–174. doi:10.1111/j.1742-4658.2008.06770.x

Pandey, A., Chang, J.-S., Hallenbeck, P. C., és Larroche, C. (2013). *Biohydrogen*. Newnes.

Panwar, N. L., Kaushik, S. C., és Kothari, S. (2011). Role of renewable energy sources in environmental protection: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15(3), 1513–1524. doi:10.1016/j.rser.2010.11.037

Pfennig, N., és Trüper, H. G. (1992). The Family Chromatiaceae. In A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, és K.-H. Schleifer (Eds.), *The Prokaryotes* (pp. 3200–3221). Springer New York. Retrieved from http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4757-2191-1_8

Pott, A. S., és Dahl, C. (1998). Sirohaem sulfite reductase and other proteins encoded by genes at the *dsr* locus of *Chromatium vinosum* are involved in the oxidation of intracellular sulfur. *Microbiology*, 144(7), 1881–1894. doi:10.1099/00221287-144-7-1881

Prange, A., Engelhardt, H., Trüper, H. G., és Dahl, C. (2004). The role of the sulfur globule proteins of *Allochromatium vinosum*: mutagenesis of the sulfur globule protein genes and expression studies by real-time RT-PCR. *Archives of Microbiology*, 182(2-3), 165–174. doi:10.1007/s00203-004-0683-3

Rákhely, G., Colbeau, A., Garin, J., Vignais, P. M., és Kovács, K. L. (1998). Unusual organization of the genes coding for HydSL, the stable [NiFe]hydrogenase in the photosynthetic bacterium *Thiocapsa roseopersicina* BBS. *Journal of Bacteriology*, 180(6), 1460–1465.

Rákhely, G., Kovács, A. T., Maróti, G., Fodor, B. D., Csanádi, G., Latinovics, D., és Kovács, K. L. (2004). Cyanobacterial-type, heteropentameric, NAD⁺-reducing NiFe hydrogenase in the purple sulfur photosynthetic bacterium *Thiocapsa roseopersicina*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(2), 722–728.

Rákhely, G., Laurinavichene, T. V., Tsygankov, A. A., és Kovács, K. L. (2007). The role of Hox hydrogenase in the H₂ metabolism of *Thiocapsa roseopersicina*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1767(6), 671–676. doi:10.1016/j.bbabi.2007.02.004

Rother, D., Henrich, H. J., Quentmeier, A., Bardischewsky, F., és Friedrich, C. G. (2001). Novel genes of the sox gene cluster, mutagenesis of the flavoprotein SoxF, and evidence for a general sulfur-oxidizing system in *Paracoccus pantotrophus* GB17. *Journal of Bacteriology*, 183(15), 4499–4508. doi:10.1128/JB.183.15.4499-4508.2001

Sánchez, O., Ferrera, I., Dahl, C., és Mas, J. (2001). In vivo role of adenosine-5'-phosphosulfate reductase in the purple sulfur bacterium *Allochromatium vinosum*. *Archives of Microbiology*, 176(4), 301–305. doi:10.1007/s002030100327

Sander, J., és Dahl, C. (2009). Metabolism of Inorganic Sulfur Compounds in Purple Bacteria. In C. N. Hunter, F. Daldal, M. C. Thurnauer, és J. T. Beatty (Eds.), *The Purple Phototrophic Bacteria* (pp. 595–622). Springer Netherlands. Retrieved from http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4020-8815-5_30

Sander, J., Engels-Schwarzlose, S., és Dahl, C. (2006). Importance of the DsrMKJOP complex for sulfur oxidation in *Allochromatium vinosum* and phylogenetic analysis of related complexes in other prokaryotes. *Archives of Microbiology*, 186(5), 357–366. doi:10.1007/s00203-006-0156-y

Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G., és Pühler, A. (1994). Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene*, 145(1), 69–73.

Schoepp-Cothenet, B., Lieutaud, C., Baymann, F., Verméglio, A., Friedrich, T., Kramer, D. M., és Nitschke, W. (2009). Menaquinone as pool quinone in a purple bacterium. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(21), 8549–8554. doi:10.1073/pnas.0813173106

Stockdreher, Y., Sturm, M., Josten, M., Sahl, H.-G., Dobler, N., Zigann, R., és Dahl, C. (2014). New Proteins Involved in Sulfur Trafficking in the Cytoplasm of *Allochromatium vinosum*. *Journal of Biological Chemistry*, 289(18), 12390–12403. doi:10.1074/jbc.M113.536425

Stoffels, L., Krehenbrink, M., Berks, B. C., és Uden, G. (2012). Thiosulfate reduction in *Salmonella enterica* is driven by the proton motive force. *Journal of Bacteriology*, 194(2), 475–485. doi:10.1128/JB.06014-11

Sun, L., Åkermark, B., és Ott, S. (2005). Iron hydrogenase active site mimics in supramolecular systems aiming for light-driven hydrogen production. *Coordination Chemistry Reviews*, 249(15–16), 1653–1663. doi:10.1016/j.ccr.2005.01.013

Szőri-Dorogházi, E., Maróti, G., Szőri, M., Nyilasi, A., Rákhely, G., és Kovács, K. L. (2012). Analyses of the large subunit histidine-rich motif expose an alternative proton transfer pathway in [NiFe]-hydrogenases. *PloS One*, 7(4), e34666. doi:10.1371/journal.pone.0034666

Troshina, O., Serebryakova, L., Sheremetieva, M., és Lindblad, P. (2002). Production of H₂ by the unicellular cyanobacterium *Gloeocapsa alpicola* CALU 743 during fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27(11–12), 1283–1289. doi:10.1016/S0360-3199(02)00103-9

Vignais, P. M., és Billoud, B. (2007). Occurrence, classification, and biological function of hydrogenases: an overview. *Chemical Reviews*, 107(10), 4206–4272. doi:10.1021/cr050196r

Visscher, P. T., Nijburg, J. W., és Gernerden, H. van. (1990). Polysulfide utilization by *Thiocapsa roseopersicina*. *Archives of Microbiology*, 155(1), 75–81. doi:10.1007/BF00291278

Weissgerber, T., Zigann, R., Bruce, D., Chang, Y., Detter, J. C., Han, C., ... Dahl, C. (2011). Complete genome sequence of *Allochrochromatium vinosum* DSM 180T. *Standards in Genomic Sciences*, 5(3), 311–330. doi:10.4056/sigs.2335270

Welte, C., Hafner, S., Krätzer, C., Quentmeier, A., Friedrich, C. G., és Dahl, C. (2009). Interaction between Sox proteins of two physiologically distinct bacteria and a new protein involved in thiosulfate oxidation. *FEBS Letters*, 583(8), 1281–1286. doi:10.1016/j.febslet.2009.03.020

Xydis, G. (2013). Comparison study between a Renewable Energy Supply System and a supergrid for achieving 100% from renewable energy sources in Islands. *International Journal of Electrical Power és Energy Systems*, 46, 198–210. doi:10.1016/j.ijepes.2012.10.046

Zander, U., Faust, A., Klink, B. U., Sanctis, D. de, Panjikar, S., Quentmeier, A., ... Scheidig, A. J. (2011). Structural Basis for the Oxidation of Protein-bound Sulfur by the Sulfur Cycle Molybdohemo-Enzyme Sulfane Dehydrogenase SoxCD. *Journal of Biological Chemistry*, 286(10), 8349–8360. doi:10.1074/jbc.M110.193631

Zorin, N. A., és Lindblad, P. (1993). Localization of hydrogenase in the purple sulphur bacterium *Thiocapsa roseopersicina*. *Archives of Microbiology*, 160(2), 96–100. doi:10.1007/BF00288709

Köszönetnyilvánítás

Köszönetet szeretnék mondani az SZTE Biotechnológiai Tanszék és az MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont Biofizikai Intézet minden dolgozójának, hogy segítették munkámat.

Szeretném megköszönni Dr. Rákhely Gábornak, hogy egyetemi és Ph.D. tanulmányaim alatt irányítása alatt dolgozhattam. Köszönöm értékes szakmai tanácsait, bátorítását és támogatását. Prof. Kovács Kornélnak, hogy lehetővé tette munkámat a Biotechnológiai Tanszéken. Külön köszönet illeti Dr. Palágyi Mészáros Líviát, aki munkám kezdete során segített, megismertetett a projekthez tartozó alapvető molekuláris biológiai technikákkal. Hálás vagyok Doffkay Zsoltnak, és Győri Editnek munkámhoz nyújtott önzetlen segítségükért, nélkülük ez a dolgozat nem készülhetett volna el.

Köszönöm Duzs Ágnesnek a szulfidfüggő kinon reduktázokról nyújtott naprakész információit, és Balogh Tímeának a rendelkezésemre bocsátott pDSKrt5Km vektort. Köszönettel tartozom Verebély Rózsának nélkülözhetetlen technikai segítségéért. Köszönöm még a munkában való közreműködést Csata Tündének, Ondrésik Mártának, Orosz Jánosnak, Szabó Enikőnek, Simonkovich Sebestyénnek. Köszönöm a sok hasznos beszélgetést Dr. Tóth Andrásnak, Nyilasi Andreának továbbá Dr. Nagy Lászlónak az SZTE Biofizikai Tanszékén és Dr. Kovács Lászlónak az MTA SZBK Növénybiológia Intézetében. Köszönöm a közös munkát melyből sokat tanultam Dr. Garab Győzőnek, Dr. Maróti Gergőnek, Dr. Fülöp Andrásnak, Béres Ritának, Tuboly Eszternek, Nagy Valériának.

Köszönöm még Kis Ágnesnek barátságát és a dolgozat megírásakor adott tanácsait. Továbbá hálával tartozom családomnak, akik tanulmányaim során mindvégig bíztattak, támogattak, akikre szintén mindig számíthattam.

Nem felejtettem el megköszönni azon szervezeteknek sem, akik ösztöndíjakkal támogatták munkámat: Federation of European Biochemical Societies, Federation of European Microbiological Societies.

Továbbá a kutatás a TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 Nemzeti Kiválóság Program című kiemelt projekt keretében zajlott. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.

Saját közlemények jegyzéke

Közlemények melyek a dolgozat alapját képezték

Tengölics, R., Mészáros, L., Doffkay, Zs., Győri, E., Kovács, K.L., Rákhely G. (2014)
Connection between the membrane electron transport system and Hyn hydrogenase in the
purple sulfur bacterium, *Thiocapsa roseopersicina* BBS. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Aug 8;
1837(10):1691-1698. doi: 10.1016/j.bbabo.2014.07.021. IF: 4,829

Fülöp, A., Béres, R., Tengölics, R., Rákhely, G., és Kovács, K. L. (2012). Relationship
between PHA and hydrogen metabolism in the purple sulfur phototrophic bacterium *Thiocapsa*
roseopersicina BBS. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(6), 4915–4924.
doi:10.1016/j.ijhydene.2011.12.019 IF:3,548

Közlemények melyek nem képezték a dolgozat alapját

Tuboly, E., Szabó, A., Erős, G., Mohácsi, A., Szabó, G., Tengölics, R., Boros, M. (2013).
Determination of endogenous methane formation by photoacoustic spectroscopy. *Journal of*
Breath Research, 7(4), 046004. doi:10.1088/1752-7155/7/4/046004 IF: 2,57

Nagy, V., Tengölics, R., Schansker, G., Rákhely, G., Kovács, K. L., Garab, G., és Tóth, S. Z.
(2012). Stimulatory effect of ascorbate, the alternative electron donor of photosystem II, on the
hydrogen production of sulphur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii*. *International Journal of*
Hydrogen Energy, 37(10), 8864–8871. doi:10.1016/j.ijhydene.2012.02.002 IF:3,548

Boboescu, I. Z., Gherman, V. D., Mirel, I., Pap, B., Tengölics, R., Rákhely, G., Maróti, G.
(2014). Simultaneous biohydrogen production and wastewater treatment based on the selective
enrichment of the fermentation ecosystem. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(3),
1502–1510. doi:10.1016/j.ijhydene.2013.08.139 IF:3,548

Egyéb közlemények - Konferencia előadások - Poszterek

BIODEGRADATION OF UNCTUOUS WASTES OF FOOD INDUSTRY Ágnes Kis, K. Laczi R. Tengölics, K.L. Kovács, G. Rákhely and K. Perei PROCEEDINGS OF THE 17th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ANALYTICAL AND ENVIRONMENTAL PROBLEMS, 2011, Szeged, ISBN: 978-963-315-066-5

INDUSTRIAL MICROBIOLOGY FOR THE PRODUCTION OF BIOHYDROGEN AND BIOGAS KORNÉL L. KOVÁCS, Z. BAGI, E. KOVÁCS, G. MARÓTI, E. SZŐRI-DOROGHÁZI, N. ÁCS, R. WIRTH, R. TENGÖLICS, A. FÜLÖP, G. RÁKHELY Acta Immunologica Hungarica 16th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology 2011 Keszthely. IF: 0,6

SIMULTANEOUS BIOHYDROGEN PRODUCTION AND WASTEWATER TREATMENT BASED ON THE SELECTIVE ENRICHMENT OF THE FERMENTATION ECOSYSTEM Iulian Zoltan Boboescu, Vasile Daniel Gherman, Ion Mirel, Bernadett Pap, Roland Tengölics, Gábor Rákhely, Éva Kondorosi and Gergely Maróti IREC 2012, The International Renewable Energy Congress Paper

Kőolajipari és élelmiszeripari biodegradációja Kis Ágnes, Laczi Krisztián, Tengölics Roland, Zsíros Szilvia, Kovács L. Kornél, Rákhely Gábor és Perei Katalin Környezettudományi Doktori Iskolák Konferenciája 2012 Budapest ISBN szám: 978-963-284-242-4

Biodegradation of unctiuous waste of food industry 17th International Symposium On Analytical and Environmental Problems 2012 Pécs Ágnes Kis, K. Laczi, R. Tengölics, K.L. Kovács, G. Rákhely and K. Perei ISBN szám: 978-963-315-066-5

Metabolic and electron transport connections of Hyn hydrogenase in purple sulfur bacterium, *Thiocapsa roseopersicina* BBS. Roland Tengölics, Zolt Doffkay, Kornél L. Kovács Gábor Rákhely I. Innováció a Természettudományban - Doktorandusz Konferencia 2014 Szeged

(ISBN:978-963-9970-52-6)

Konferencia előadások:

Metabolic linkages of the Hyn hydrogenase in *Thiocapsa roseopersicina* BBS Roland Tengölics, Livia S. Palágyi-Mészáros, Kornél L. Kovács, Gábor Rákhely SOLAR-H2 szimpózium Tarragona Spanyolország 2009. Március 31.- Április 3.

Connection between sulfur metabolism and Hyn hydrogenase of *Thiocapsa roseopersicina*. Roland Tengölics, Livia Mészáros, Tünde Csata, Márta Ondrész, Edit Győri, Kornél Kovács and Gábor Rákhely Bacterial Electron Transport and its Regulation Lund 2011 május 11-15

Experimental approaches in hydrogenase research. EBSA Biophysics Course on Solar Energy nyári egyetem 2011 Július.

Hydrogenase related metabolic networks in *Thiocapsa roseopersicina* Roland Tengölics, Rita Béres, Zsolt Doffkay, Tünde Csata, János Orosz, Sebestyén Simonkovich, Márta Ondrész, Edit Győri, Kornél L. Kovács and Gábor Rákhely 10th Hydrogenase Conference Szeged, 2013 Július 8-12.

Posztterek:

Metabolic networking of hydrogenases in photosynthetic purple sulfur bacteria Roland Tengölics, Rita Béres, Zsolt Doffkay, Edit Győri, Kornél L. Kovács and Gábor Rákhely New approaches and concepts in microbiology 2013. Október Heidelberg

Connections between sulfur metabolism and Hyn hydrogenase of *Thiocapsa roseopersicina* BBS. Roland Tengölics, Livia Mészáros, Zsolt Doffkay, András Tóth, Ágnes Duzs, Edit Győri, Kornél Kovács, and Gábor Rákhely. 2012 április 15-18 Noordwijkerhout EMBO Workshop on Microbial Sulfur Metabolism.

Összesített impakt faktor: 18,043

MTMT azonosító: 10030464