

A HupSL és Hox1 NiFe hidrogenáz enzimek összehangolt szabályozásának vizsgálata *Thiocapsa roseopersicina* baktériumban

Ph.D. értekezés tézisei

Készítette:

Nagy Ildikó Katalin

Témavezetők:

Dr. Maróti Gergely

Dr. Rákhely Gábor

Biológia Doktori Iskola

Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai
Kutatóközpont, Biokémiai Intézet
Szegedi Tudományegyetem, TTIK, Biotechnológiai Tanszék

Szeged
2016.

Bevezetés

Napjainkban elsősorban fosszilis energiahordozókat használunk, ezek keletkezése azonban sokkal lassabb, mint felhasználásuk sebessége. A szénalapú energiaforrásaink kitermelése rendkívül környezetszennyező, felhasználásuk során nagy mennyiségű, üvegházhatást okozó gáz szabadul fel és kerül a légterbe, aminek következményeként már napjainkban is tapasztalható a globális felmelegedés, Földünk klímájának nem természetes megváltozása. Mindez alternatív, megújuló energiaforrások kutatására sarkall bennünket. Az új energiahordozókkal szemben támasztott követelmények a következők: legyen környezetbarát, olcsó, nagy mennyiségben elérhető és biztonságosan tárolható.

A napenergia a legkézenfekvőbb és legnagyobb természetes energiaforrás, amely hidrogénné alakítható, akár biológiai úton is. A hidrogén (H_2) sok szempontból megfelelő megújuló energiaforrásként szolgálhat, hiszen nem toxikus, nem rákkeltő, nem radioaktív és a környezetbe történő kijuttatása sem okoz környezetszennyezést, az elégetése során keletkező egyetlen melléktermék a víz. Molekuláris hidrogén előállítható kémiai reakciókkal, valamint biológiai úton a víz biofotolízisével, mely algákkal és cianobaktériumokkal valósítható meg, továbbá szerves vegyületek sötét fermentációja révén anaerob baktériumokkal és fotofermentáció útján fotoszintetikus baktériumokkal. Kizárólag alacsonyabb rendű élőlények (archaeák, baktériumok és eukarióta algák) rendelkeznek olyan ősi enzimekkel, melyek képesek hidrogén fejlesztésére protonok és elektronok felhasználásával. Ezek a hidrogenáz és a nitrogenáz enzimek.

A hidrogenázok hasznosak lehetnek, mint a tiszta energiahordozó termelői, illetve helyettesíthetik az üzemanyagcellákban a platina alapú elektródokat a hidrogén bontása során. Akár egész sejtes rendszerek is használhatóak a mikrobiális energiacellák anód oldalán elektrontermelésre,

természetes szubsztrátokat vagy például hidrogént használva elektronforrásként.

Az ősi hidrogenáz enzimek különféle anyagcsere-folyamatokban vesznek részt és rendkívül változatosak mind funkciójukat, mind felépítésüket tekintve. A hidrogenázok a hidrogén oxidációját valamint a protonok redukcióját katalizálják. A hidrogenázok a felépítésük, a sejtbeli elhelyezkedésük és szerepük alapján is csoportosíthatóak. A legtöbb hidrogenáz enzim NiFe aktív centrummal rendelkezik, találhatunk köztük membránhoz kapcsolt, valamint citoplazmatikus enzimeket egyaránt. Funkció alapján négy csoportot különíthetünk el. A H₂ felvételére képes hidrogenázok legfontosabb feladata az energianyerés elsősorban a nitrogenáz által melléktermékként termelt hidrogén visszavételével. A hidrogéntermelő hidrogenázok a sejt elektronháztartásának egyensúlyban tartása érdekében a protonok redukciójával állítják elő a molekuláris hidrogént és a sejt elektrontöbbletét a sejten kívülre juttatják. Bizonyos hidrogenázok H₂ felvételére és termelésére egyaránt képesek, úgynevezett kétirányú enzimek, amelyek a sejt energetikai viszonyainak megfelelően preferálják a nukleotid típusú kofaktorok redukáló vagy oxidáló formáit. A szenzor típusú hidrogenázok a sejt környezetében lévő H₂ mennyiségétől függően szabályozzák más hidrogenázok működését.

Annak érdekében, hogy gazdaságosan és környezetbarát módon tudjunk mikroorganizmusokkal vagy a belőlük izolált enzimekkel minél nagyobb mennyiségű tiszta hidrogént előállítani, meg kell ismernünk a működésükhöz szükséges optimális körülményeket, az enzimek pontos szerkezetét, érését, szabályozását és metabolikus kapcsolatait, hogy módosítani tudjuk őket a jobb és hatékonyabb hasznosítás érdekében.

Modellorganizmusunk, a *Thiocapsa roseopersicina* egy Gram negatív bíbor kénbaktérium, laboratóriumi körülmények között jól tenyészthető, genetikailag manipulálható mikroorganizmus. Mivel a *T. roseopersicina*

különböző felépítésű, elhelyezkedésű és funkciójú hidrogenáz enzimekkel rendelkezik, tanulmányozása kiváló lehetőséget nyújt a hidrogenázok széleskörű megismeréséhez.

A *T. roseopersicina* négy aktív NiFe hidrogenázzal rendelkezik, amelyek közül kettő membránkapcsolt (HynSL és HupSL), kettő pedig citoplazmatikus (Hox1 és Hox2) enzim. A HynSL és a Hox1 kétirányú enzimek, ezzel szemben a HupSL *in vivo* kizárólag hidrogén visszavételére, míg a Hox2 hidrogéntermelésre képes hidrogenáz. A *T. roseopersicina* genomban megtalálhatóak a *hupUV* és *hupT/hupR* gének, melyek egy hidrogén érzékelő rendszer elemeit alkotják más baktériumokban, azonban ezen gének – a *hupT* kivételével – a *T. roseopersicina*-ban a vizsgált körülmények között nem fejeződnek ki, így nem befolyásolják a HupSL hidrogenáz működését. A *hupSL* gének expresszióját a sejtek számára rendelkezésre álló tioszulfát mint fő elektrondonor szabályozza, csökkentett tioszulfát koncentráció magasabb szintű *hupSL* génkifejeződést eredményez.

Célkitűzés

A *Thiocapsa roseopersicina* HupSL membránkapcsolt hidrogenáza felelős a nitrogénáz enzim által termelt hidrogén sejtbe történő visszapumpálásáért. Az operont alkotó csaknem összes gén által kódolt fehérje szerepét, működését pontosan ismerjük. A *hupI* és *hupR* gének között elhelyezkedő, ez idáig *orf*-ként nyilvántartott gén által kódolt potenciális fehérje funkciója azonban tisztázatlan volt.

Ezen gén által kódolt fehérje megismeréséhez célul tűztem ki:

- A *hupI* és *hupR* között elhelyezkedő *hupO* gén deléciós mutáns analízisét (beleértve a homológ komplementációt) annak érdekében, hogy megvizsgáljam a *hupO* gén és terméke sejtben betöltött szerepét.
- A HupSL hidrogenáz *in vivo* és *in vitro* aktivitásának vizsgálatát a HupO fehérje jelenlétében és hiányában.
- A *hupSL* struktúrgének expressziós analízisét különböző *T. roseopersicina* törzsekben.
- A HupSL hidrogenáz expressziójának hidrogénfüggését.
- A HupSL és a további NiFe hidrogenázok közötti kapcsolatok vizsgálatát, elsősorban a HupSL és Hox1 enzimek interakcióit.

A *T. roseopersicina* Hox1 citoplazmatikus hidrogenáz ötödik alegységének, a Hox1E-nek a sejtben betöltött pontos szerepe nem ismert, hasonlóan a *R. eutropha* szolubilis hidrogenáz HoxI alegységéhez. Feltételeztem, hogy a hasonló felépítésű fehérjék képesek helyettesíteni egymást, a heterológ alegységek jelenléte befolyásolja a szolubilis hidrogenáz enzim működését.

A felmerült kérdések megválaszolásához a következő célokat tűztem ki:

- A HoxI heterológ fehérjét expresszáltatni különböző *T. roseopersicina* törzsekben.

- Megvizsgálni, hogy a HoxI jelenléte hogyan befolyásolja a *T. roseopersicina* HoxI hidrogenázának működését.
- Meghatározni, hogy a *hoxIE* mutáció következtében a HoxI működésében bekövetkezett változásokat képes-e helyreállítani a heterológ HoxI fehérje.
- A *hoxIE* mutációjának valamint a *hoxI* bevitelének a globális génexpresszióra gyakorolt hatásának vizsgálata.

Módszerek

A DNS manipulációs lépéseket az általános gyakorlatnak, illetve az egyes gyártók utasításainak megfelelően végeztem. Az általam előállított plazmidokat *E. coli*-ba transzformálással, *T. roseopersicina*-ba konjugációval juttattam be. A HupO fehérje szerepének vizsgálatához irányított deléciós mutagenézist végeztem. A HoxI heterológ fehérjét plazmidról expresszáltattam a *T. roseopersicina* törzsekben.

Gázkromatográfiás mérésekkel határoztam meg a törzsek hidrogéntermelő aktivitását, illetve a légtérből felvett hidrogén mennyiségét *in vivo* és *in vitro* egyaránt.

A génkifejeződés mértékének megállapításához RNS-t izoláltam a különböző körülmények között növesztett *T. roseopersicina* mutáns törzsekben, majd reverz transzkripcióval kapcsolt valós idejű PCR reakciókkal határoztam meg a gének expressziós szintjét.

A fehérjeszintű kísérletekhez a sejtek feltárással sejtextraktumot készítettem. HupL, illetve HoxI specifikus ellenanyagok használatával Western hibridizációs analíziseket végeztem, így vizsgáltam az adott fehérjék szintjét a sejtben.

Eredmények

Munkám során a *T. roseopersicina hupSL* operonjában *hupO*-ként azonosított gén által kódolt fehérje működését, sejtben betöltött szerepét vizsgáltam.

- Elkészítettem a *hupO* deléciós mutációt és a homológ komplementációt tartalmazó *T. roseopersicina* törzseket annak érdekében, hogy specifikusan tudjam vizsgálni a HupO fehérje HupSL hidrogenázra gyakorolt hatását.
- *In vivo* és *in vitro* aktivitás mérések során egyaránt azt tapasztaltam, hogy alacsony tioszulfát koncentráció (1 g/l és 2 g/l) alkalmazásakor a $\Delta hupO$ törzs szignifikánsan nagyobb hidrogén felvevő aktivitást mutat, mint a komplett *hupSL* operont tartalmazó törzs. A *hupO* gén plazmidon történő visszavitele az eredeti, alacsonyabb hidrogenáz aktivitást visszaállította. A $\Delta hupO$ törzs magasabb hidrogén felvevő aktivitása kizárólag alacsony tioszulfát koncentrációjú tápoldatban történő növesztéskor volt megfigyelhető. Magas tioszulfát koncentráció (4 g/l) mellett a *hupO* gént tartalmazó, illetve a mutáns törzs egyaránt minimális hidrogenáz aktivitást mutatott.
- A *hupSL* struktúrgének expressziós mintázatának vizsgálatakor megállapítottam, hogy a *hupO* gén hiányában, valamint azokban a törzsekben, amelyekben a Hox1 hidrogenáz aktív, nagyságrendekkel magasabb génkifejeződés figyelhető meg alacsony tioszulfát koncentráció mellett. Abban az esetben, amikor a Hox1 hidrogenáz nem aktív, de a HupO funkcionális, alacsony szintű génexpresszió jellemzi a *hupSL* géneket alacsony és magas tioszulfát koncentráció mellett egyaránt. A vad típusú *T. roseopersicina* törzs, illetve az aktív HupSL és Hox1 hidrogenázokat tartalmazó törzs szintén magas *hupSL* expressziós értékeket mutattak.

- Korábbi kutatások azt mutatták, hogy a *T. roseopersicina*-ban található HupSL hidrogenáz működése független a H₂ jelenlététől. Kísérleteim során azt tapasztaltam, hogy a komplett Hox1 hidrogenáz tartalmazó törzsek esetében a *hupO* gén jelenléte illetve hiánya nem befolyásolja a HupSL működését, hidrogén-függés valóban nem tapasztalható. A Hox1 hidrogenáz aktív formában nem tartalmazó törzsből a $\Delta hupO$ mutáció hatására azonban mRNS és fehérjeszinten egyaránt jelentős hidrogén-függés volt megfigyelhető alacsony tioszulfát koncentráció alkalmazása mellett.

A *Ralstonia eutropha* HoxI fehérjéjének hatását vizsgáltam különböző *T. roseopersicina* törzsekben, elsősorban a Hox1 hidrogenáz funkciójára fókuszálva.

- A heterológ *hoxI* gént expressziós vektoron juttattam be különböző *T. roseopersicina* hidrogenáz mutáns törzsekbe, a HoxI heterológ fehérje kifejeződését a törzsekben Western analízissel igazoltam.
- Összehasonlító hidrogéntermelési vizsgálatok során megállapítottam, hogy a HoxI fehérje pozitívan befolyásolja a Hox1 hidrogenáz hidrogéntermelő aktivitását magas tioszulfát koncentráció (4 g/l) alkalmazása mellett. A tioszulfát koncentrációjának növelésével (8 g/l) egyre nagyobb különbség figyelhető meg a *hoxI*-t tartalmazó és a *hoxI*-mentes törzsek hidrogéntermelésében a heterológ fehérjét tartalmazó törzsek javára.
- A heterológ HoxI fehérje nem képes helyettesíteni a feltételezhetően hasonló *in vivo* funkciójú homológ Hox1E-t. A $\Delta hox1E$ törzs *in vivo* Hox1 általi hidrogéntermelésre nem képes, a *hoxI* gén bevitele pedig nem tudta helyreállítani az Hox1 *in vivo* aktivitását.

- Teljes transzkriptom analízissel azonosítottam azokat a géneket, amelyek expresszióját befolyásolja a *hox1E* deléciója, valamint a *hox1* gén bevitel. A *hox1* és *hox2* hidrogenáz struktúrgének kifejeződése jelentősen lecsökkent a *hox1E* hiányában – kivéve a *hox1H* gént –, ezen csökkent expressziós értékeket a *hox1* bevitel szinte teljes mértékben visszaállította a komplett *hox1* operont tartalmazó törzs szintjére. Hasonló megfigyelést tettem a fotoszintetikus reakcióközpont alegységeit kódoló gének, valamint a fénygyűjtő komplex α és β alegységeket kódoló gének expressziója esetében. Ezen gének expressziója szintén jelentősen lecsökken a *hox1E* hiányában, azonban a *hox1* gén jelenlétében az expressziós szintek csaknem megegyeznek a komplett *hox1* operont tartalmazó törzsben mért értékekkel. Két olyan gént találtam, amelyek expressziója a *hox1E* hiányában lecsökken és a *hox1* jelenléte ellenére is alacsony szinten marad. A NADH dehidrogenáz 5-ös alegységét kódoló gén, valamint egy hipotetikus transzmembrán fehérje génje (amely homológ a NADH-ubikinon-oxidoreduktáz láncban résztvevő egyik fehérjével) tartozik ebbe a csoportba. Vélhetően e két fehérjének kulcsszerepe van a *hox1E* mutáció hatására megfigyelt *in vivo* Hox1 aktivitás megszűnésében.

A dolgozat alapjául szolgáló közlemény

Nagy Ildikó Katalin, Kovács L. Kornél, Rákhely Gábor és Maróti Gergely (2016). HupO is a novel regulator involved in thiosulfate-responsive control of HupSL NiFe-hydrogenase synthesis in *Thiocapsa roseopersicina*. *Applied and Environmental Microbiology* **82**:2039-2049. IF: 3,67

Egyéb közlemények

Maróti Judit, Farkas Attila, Nagy Ildikó Katalin, Maróti Gergely, Kondorosi Éva, Rákhely Gábor és Kovács L. Kornél (2010). A Second soluble NiFe enzyme completes the hydrogenase set in *Thiocapsa roseopersicina*. *Applied and Environmental Microbiology* **76**:5113-5123. IF: 3,80

Pap Bernadett, Györkei Ádám, Iulian Z Boboescu, Nagy Ildikó Katalin, Bíró Tibor, Kondorosi Éva és Gergely Maróti (2014). Temperature-dependent transformation of biogas-producing microbial communities points to the increased importance of hydrogenotrophic methanogenesis under thermophilic operation. *Bioresource Technology* **177**:375-380. IF: 5,09

Összesített impakt faktor: 12,56

MTMT azonosító: 10046310