

**NiFe hidrogenáz enzimek
bioszintézisének vizsgálata
T. roseopersicina-ban**

Ph.D. Tézisek

Maróti Gergely

Témavezetők:

Prof. Kovács L. Kornél
Dr. Rákhely Gábor

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

Szeged

2005

Bevezetés

Környezetkímélő energiaforrások felhasználható formában, nagy mennyiségben és tisztaságban való előállítása az elkövetkezendő időszak egyik legaktuálisabb kihívása. Az esélyes jelöltek közt van a hidrogén, még hozzá a biológiai úton előállított biohidrogén. Számos mikroszkópikus méretű élőlény rendelkezik hidrogéntermelő képességgel. A hidrogén termelését ezen organizmusok hidrogenáz és nitrogenáz enzimeikkel végzik. A hidrogenázok a hidrogéntermelés mellett a molekuláris hidrogén felvételére is képesek, az élő sejtben működésük irányát az aktuális anyagcserefolyamatok határozzák meg.

A hidrogenázokat a növekvő diverzitás (méret, negyedleges szerkezet, elektron donorok és akceptorok minősége) ellenére három osztályba sorolják az aktív centrum fémtartalmát alapul véve. Ezek a [Fe], [NiFe] és a fémet nem tartalmazó hidrogenázok.

A [NiFe] hidrogenázok két alegységből álló heterodimert képeznek. A nagy alegység tartalmazza az aktív centrumot. Az aktív centrum (NiFe (CN)₂ (CO)) szerkezetet mutat. A CO és a két CN ligand a vas atomhoz kapcsolódik. Az aktív centrum két, a nagy alegység N- illetve C-terminálisán található CxxC motívumokon keresztül épül be a fehérjeszerkezetbe. A kis alegységben található vas-kén (Fe-S) centrumok vesznek részt az elektronok továbbításában az aktív centrum és a fiziológiai elektron akceptorok/donorok között. A [NiFe] hidrogenázokban [4Fe-4S] és

[3Fe-4S] kockák biztosítják az elektronok áramlását az aktív centrumtól a funkcionális partner felé, ami pl. citokróm lehet.

Az aktív centrum összetett szerkezetét tekintve érthető, hogy a funkcióképes, működő hidrogenáz enzimek bioszintézise több lépésből álló, igen összetett folyamat, melyhez számos gén termékének jelenléte szükséges. A főbb lépések az inaktív alegységek bioszintézise, a CN^- és CO kétatomos ligandok szintézise, beépítése, a Fe és Ni atomok fehérjébe ágyazódása, valamint utolsó lépésként a nagy alegység C-terminálisának hasítása melyet egy specifikus proteáz végez. Ezeket a folyamatokat végzik a kiegészítő gének által kódolt fehérjék.

A *Thiocapsa roseopersicina* BBS fototróf bíbor kénbaktérium legalább három, működő hidrogenáz enzimet tartalmaz. Mindhárom enzim a [NiFe] hidrogenázok csoportjába tartozik, kettő a membránhoz kapcsolódik (HynSL, HupSL), egy pedig a citoplazmában található (HoxYH). A [NiFe] hidrogenázok bioszintézisének alapelvei az aktív centrum és fehérjekörnyezetének erős konzerváltsága miatt valószínűleg ezen enzimekre is érvényesek.

Fő célom a *T. roseopersicina* hidrogenázai érésének részletes tanulmányozása volt, a bioszintézisben résztvevő komponensek és kölcsönhatásaiknak azonosítása révén. Az összeszerelődés megértése nagyban hozzájárulhat ahhoz, hogy heterológ gazdában vagy *in vitro* jól működő, nagy stabilitású hidrogenázt hozzunk létre.

Módszerek

A DNS manipulációs eljárásokat az általános gyakorlatnak, illetve az egyes gyártók utasításainak megfelelően végeztem. *E. coli*-ba a plazmidokat transzformálással illetve elektroporálással, *T. roseopersicina*-ba konjugációval juttattam be. Vizsgálataimhoz különböző mutagenézis technikákat használtam, a kisegítő gének megkeresése transzpozonos mutagenézissel történt. A megtalált kisegítő gének szerveződését, szabályozását β -galaktozidáz aktivitás méréssel és RT-PCR alkalmazásával elemeztük. A kisegítő gének szerepét első megközelítésben deléciós mutagenézissel vizsgáltam, ahol szükséges volt, a leolvasási keretet megőrző deléciókat hoztam létre. A kapott mutáns törzsek jellemzését hidrogenáz aktivitás méréssel végeztem, minden esetben szelektíven mérve mind a hidrogén-fejlesztő, mind a hidrogén-felvevő aktivitását az egyes hidrogenáz enzimeknek. A bioszintézis során kialakuló komplexek azonosítása céljából egy expressziós vektorrendszert hoztunk létre, mely a kívánt fehérjék affinitás oszlopon történő tisztítását tette lehetővé. Ezekkel a konstrukciókkal végeztem a homológ komplementációs kísérleteket is.

Eredmények

Munkám során a [NiFe] hidrogenázok bioszintézisében résztvevő kisegítő fehérjéket vizsgáltam, modellorganizmusként a fotoszintetizáló bíbor kénbaktériumot, a *Thiocapsa roseopersicina*-t használva. A kisegítő gének egy része specifikus, míg másik csoportjuk minden, a sejtben megtalálható [NiFe] hidrogenáz enzim érésehez nélkülözhetetlen. Kísérleteim eredményeit az alábbi állításokban foglalom össze:

Számos kisegítő fehérje génjét azonosítottam transzpozonos mutagenézissel. Az M442-es mutáns törzsben a *hupK-hypC₁-hypD-hypE* géneket találtam, míg az M4711-es törzsben a transzpozon a *hynD* génbe épült be. A *hynD* gén közelében, vele ellentétes orientációban egy másik, *hypC* jellegzetességeket mutató gént találtam, melyet *hypC₂*-nek neveztem el.

A jelenleg folyamatban lévő genomszekvenálás részleges adatait használva az addig hiányzó *hypA* és *hypB* géneket megtaláltam.

A kisegítő gének szerveződését RT-PCR-rel vizsgáltam, ez alapján a *hypC₁-hypDE* gének a *hupK* génnel közösen íródnak át, emellett azonban a *hypC₁-hypDE* géneknek saját szabályozó régiója is van, melyet a homológ komplementációs kísérletek bizonyítottak.

A *hupD* és a *hoxW* gének operonba szerveződését RT-PCR támasztotta alá, a *hupD* a *hupSLC* génekkel, a *hoxW* a *hoxEFUYH* génekkel alkot operont. A harmadik endopeptidáz kódoló gén, a *hynD*, az FNR anaerob szabályozó rendszer által nem regulált, annak ellenére, hogy a célfehérjét kódoló *hynSL* gének e rendszer ellenőrzése alatt állnak.

A *hupK* génben a leolvasási keretet megőrző deléciót hoztam létre a HupK fehérje vizsgálata céljából. A mutáció eredményeképpen a membránkötött hidrogenázok (Hyn, Hup) aktivitása minimálisra csökkent, míg a szolubilis hidrogenáz (Hox) megőrizte aktivitását. Az elvégzett homológ komplementációs kísérletek visszaállították minden hidrogenáz aktivitást a sejtben.

A *hypC₁* és *hypC₂* génekben hasonló mutációkat hoztam létre különböző hidrogenázokban mutáns törzsekben a HypC fehérjék specifikitásának vizsgálatára. Az *E. coli* hidrogenáz érési modelltől eltérően, *T. roseopersicina*-ban mindkét HypC fehérjére szükség van mindhárom hidrogenáz éréséhez. A homológ komplementációs kísérletek bizonyították, hogy a mutációk megfigyelt hatásai az elrontott gének hiányának a következményei.

A mutációs analízist a három endopeptidázt kódoló gén esetében is elvégeztem. Ahogyan az várható volt, ezen gének termékei teljesen specifikusak egy-egy hidrogenáz összeszerelődesi

folyamatára. A HynD fehérje csak a HynL C-terminálisát hasítja le, a HupD csak a HupL éréséhez kell, míg a HoxW csak a Hox hidrogenáz összeszerelődésében játszik szerepet.

A kisegítő fehérjék homológ gazdából való tisztításához a laborunkban kifejlesztett expressziós vektorrendszert használtam. Az affinitás toldalékokkal ellátott HupK és HypC fehérjéket sikerült aktívan tisztítani, és néhány, az érés során létrejövő komplexet találtam. A HypC₂ fehérje kölcsönhat a stabil hidrogenáz nagy alegységével (HynL), a HypC₁ esetén pedig a szolubilis hidrogenáz nagy alegységével (HoxH) alkotott komplexet azonosítottam.

Hidrogenáz érési modellt állítottam fel *T. roseopersicina*-ra, melyben az *E. coli* modelltől való lényegi eltérést a HypC fehérjék eltérő szerepe jelenti. Ezek a kisméretű fehérjék nélkülözhetetlenek mindhárom hidrogenáz bioszintéziséhez, és nem képesek egymást helyettesíteni.

Közlemények

A disszertáció alapjául szolgáló közlemények:

Maróti, G., Fodor, B. D., Rákhely, G., Kovács Á. T., Arvani, S. and Kovács, K. L. (2003) Accessory proteins functioning selectively and pleiotropically in the biosynthesis of [NiFe] hydrogenases in *Thiocapsa roseopersicina*. *Eur. J. Biochem.* **270**:2218-2227.

Fodor, B. D., Kovács, Á. T., Csáki, R., Hunyadi-Gulyás, É., Klement, É., Maróti, G., Mészáros, L. S., Medzihradzky, K. F., Rákhely, G. and Kovács, K. L. (2004) Modular broad-host-range expression vectors for single protein and protein complex purification. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:712-721

Kovács, K. L., Kovács, Á. T., Maróti, G., Mészáros, L. S., Balogh, J., Latinovics D., Fülöp, A., Dávid, R., Dorogházi E. and Rákhely, G. (2005) The hydrogenases of *Thiocapsa roseopersicina*. *Biochemical Society Transactions* **33**: 61-63.

Rákhely, G., Kovács, Á. T., Maróti, G., Fodor, B. D., Csanádi, G., Latinovics, D. and Kovács, K. L. (2004) Cyanobacterial type, heteropentameric, NAD⁺ reducing [NiFe] hydrogenase in the purple sulfur photosynthetic bacterium, *Thiocapsa roseopersicina*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:722-728.

Kovács, K. L., Fodor, B. D., Kovács, Á. T., Csanádi, G., Maróti, G., Balogh, J., Arvani, S. and Rákhely, G. (2002) Hydrogenases, accessory genes and the regulation of [NiFe] hydrogenase biosynthesis in *Thiocapsa roseopersicina*. *Int. J. Hydrogen Energy* **27**, 1463-1469.

Egyéb közlemények:

Kovács, Á. T., Rákhely, G., Browning, D. F., Fülöp, A., Maróti, G., Busby, S. J. W. and Kovács, K. L. (2005) An FNR-type regulator controls the anaerobic expression of Hyn hydrogenase in *Thiocapsa roseopersicina*. *J Bacteriol.* (in press)

Kovács, Á. T., Rákhely, G., Balogh, J., Maróti, G., Fülöp, A. and Kovács, K. L. (2005) Anaerobic regulation of hydrogenase transcription in different bacteria. *Biochemical Society Transactions* **33**: 36-38.

Kovács, K. L., Bagi, Z., Bálint, B., Balogh, J., Dávid, R., Fodor, B. D., Csanádi, G., Hanczár, T., Kovács, Á. T., Latinovics, D., Maróti, G., Mészáros, L., Perei, K., Tóth, A. and Rákhely, G. (2004) Microbial hydrogen metabolism and environmental biotechnology. In: Environmental Biotechnology (Ed. W. Verstraete) Taylor and Francis, London. pp. 155-158.

Maróti, G. (2004) Maturation of hydrogenase enzymes in *Thiocapsa roseopersicina*. *Acta Biol. Szegediensis* **48**: 67

Kovács, K.L., Bagi, Z., Bagyinka, Cs., Bodrossy, L., Csáki, R., Fodor, B., Hanczár, T., Tusz, J., Kálmán, M., Klem, J., Kovács, Á.T., Jian, L., Magony, M., Maróti, G., Perei, K., Polyák, B., Arvani, S., Takács, M., Tóth, A. and Rákhely, G. (2000) Biohydrogen, biogas, bioremediation. *Acta Biol. Debrecina* **22**:47-54.

Maróti, G., Rákhely, G. and Kovács, K. L. (2002)

Hidrogéntermelő biogyárak. (*Hungarian*) Élet es Tudomány OTKA cikkpályázat I. hely.