

HIDROGÉN METABOLIZMUSBAN SZEREPET JÁTSZÓ
GÉNEK ÉS GÉNTERMÉKEK VIZSGÁLATA
THERMOCOCCUS LITORALIS-BAN

Doktori értekezés

Készítette:

Takács Mária

Témavezetők:

Prof. Kovács L. Kornél
Dr. Rákhely Gábor

Szegedi Tudományegyetem Biotechnológiai Tanszék
MTA SzBK Biofizikai Intézet

Szeged
2006

Bevezető

Fejlett civilizációnk - technikai vívmányainak köszönhetően - hatalmas energiaigénnyel bír. A kőolaj és földgáz készletek rohamos fogyásával egyre nagyobb figyelem összpontosul az ún. alternatív, megújuló energiaforrásokra, energiahordozókra. Az ilyen megújuló forrásokból, mint pl. a Nap, a szél, a víz energiája vagy a biomassa felhasználásával nyert energia óriási mennyiségben áll rendelkezésre, azonban ezek kiaknázása még nem igazán gazdaságos, ezért a hatékonyságot/gazdaságosságot javító kutatások száma egyre növekszik.

Az alternatív üzemanyagok közül az egyik legígéretesebb a hidrogén, mely tárolható, egyszerűen szállítható, és égése során a környezetet nem szennyező víz keletkezik. Számos mikroorganizmus képes hidrogén fejlesztésére hidrogenáz enzimei segítségével. A természetben nem elsődleges cél a hidrogén előállítás, de az evolúció során kialakult folyamatokat a modern biotechnológia segítségével saját hasznunkra fordíthatjuk. A hidrogén termelés egy módja lehet olyan mikroorganizmusok létrehozása, melyek nagy mennyiségű hidrogént termelnek a víz közvetlen biofotolízisével. Egy másik – a fényenergiát közvetve hasznosító – lehetőség a szerves hulladékok anaerob fermentációja.

A néhány évtizede felfedezett extrém körülmények között élő mikroorganizmusokra jellemző, hogy különböző környezeti hatásoknak igen ellenálló fehérjékkel rendelkeznek. A hipertermofil mikroorganizmusokból származó enzimeket e tulajdonságuknak köszönhetően már ma is széles körben alkalmazzák a biotechnológiai iparban.

A *T. litoralis* egy heterotróf hipertermofil archaebaktérium, melyet sekélytengeri, vízalatti hőforrások környékéről izoláltak. Jó alanya a

hipertermofil mikroorganizmusok kutatásának, könnyű tenyésztetősége miatt. Az eddigi eredmények szerint több szolubilis illetve membrán kötött hidrogenáz található benne, ami alkalmassá teszi hőstabil, ellenálló hidrogenázok izolálására. Mivel mind szénhidrátokat, mind peptideket képes fermentálni, miközben hidrogén fejleszt, biotechnológiai szempontból is jelentős mikroorganizmus. Laboratóriumunkban is kifejlesztettek egy olyan eljárást, amelyben állati eredetű hulladékból két lépcsőben biohidrogént fejlesztettek. A biohidrogén termelő lépésben *T. litoralis*-t használtak és a törzs ebben a rendszerben jobb hatékonysággal működött, mint pl. a közeli rokon *P. furiosus*. Ez alapján feltételezhető, hogy – bár a *T. litoralis* igen sok tekintetben hasonlít a *P. furiosus*-hoz – a két törzs metabolikus sajátásaiban van különbség. Ez a biohidrogén termelő kísérletek alapján a peptid – hidrogén anyagcsere útvonalban lakozhat, amelyből a hidrogén anyagcsere komponenseire összpontosítottam vizsgálataimat.

Célkitűzések

Munkám célja az volt, hogy a hipertermofil archaeon *Thermococcus litoralis* hidrogén anyagcseréjét és az abban résztvevő enzimeket alaposan megismerjem, jövőbeni alkalmazásuk reményében. Ezen célok elérése érdekében a következő kérdésekre próbáltam választ kapni:

⇒ Megtalálhatóak-e a mezofil mikroorganizmusokból jól ismert hidrogenáz érésben szerepet játszó fehérjéket kódoló gének a sok szempontból eltérő archaebaktériumokban, esetünkben *T. litoralis*-ban?

- ↪ Lehetséges-e az említett kisegítő gének termékeit működőképes formában termeltetni heterológ gazdában?

- ↪ Található-e *T. litoralis*-ban hidrogén fejlesztő membrán kötött hidrogenáz a már leírt szolubilis enzimek mellett?

- ↪ Mi a szerepe a sejt hidrogén metabolizmusában a szolubilis hidrogenáz-1 enzimet kódoló operontól 5' irányban megtalált gének által kódolt fehérjekomplexnek?

Módszerek

A hidrogenáz érésben szerepet játszó kisegítő géneket és a hidrogenáz struktúrgéneket *T. litoralis* genomi DNS könyvtár átvizsgálásával izoláltam. Az izolált genomi régiókat szubklónoztam, majd ezek nukleotidsorrendjét meghatároztam. A munka során standard DNS manipulációs technikákat alkalmaztam. Az izolált kisegítő géneket heterológ gazdába juttattam, és ott komplementációs vizsgálatokat végeztem. Az izolált hidrogenáz kódoló operon transzkripció aktivitását különböző tápoldatokon növesztett sejtekben abszolút kvantifikációs reverz transzkripció kapcsolt Real-Time PCR-rel vizsgáltam. A kapott eredményeket az egyik alegység ellen készített poliklonális ellenanyaggal Western hibridizációs kísérletekben fehérje szinten is ellenőriztem. Hidrogén felvevő és hidrogén fejlesztő aktivitás méréseket végeztem a különböző sejtfrakciókon. Az enzim komplexet kerámia hidroxipatit kromatográfia segítségével részlegesen tisztítottam.

Eredmények

1. Izoláltam és meghatároztam a nukleotidsorrendjét a *T. litoralis* genom egy tíz kilobázis és egy négy kilobázis hosszú szakaszának.

2. Szekvencia analízist végeztem a fent említett DNS szakaszokon, ennek eredményeképpen kiderült, hogy a négy kilobázisos szakaszon a mezofil mikroorganizmusokban jól ismert HypC és HypD hidrogenáz érésben szerepet játszó fehérjéket kódoló gének azonosíthatók. Primer extenzióval meghatároztam a transzkripció starthelyét és ez alapján a gének előtt konzervált archaeobakteriális promóter szekvenciákat azonosítottam. Bizonyítottam, hogy *hypCD* génekhez tartozó transzlációs szignálok - mint pl. a riboszóma kötőhelyek - alkalmasak bakteriális rendszerben való fehérjeexpresszióra.

3. A HypC és HypD fehérjéket heterológ gazdába *E. coli*-ba és *R. eutropha*-ba juttattam, ahol elvégeztem funkcionális analízisüket.

4. A szolubilis hidrogenáz-1 enzimet kódoló operontól 5' irányban lévő tíz kilobázis hosszú szakaszon egy nyolc génből álló operont azonosítottam, amely egy formát-dehidrogenázból, és egy hat alegységes membrán-kötött hidrogenázból álló komplex alegységeit kódolják. A gének előtt tipikus archaeobakteriális promoter régió azonosítható, és mindegyiket jellegzetes riboszómális kötőhely előzi meg. Az egyes gének elrendeződéséből arra következtettünk, hogy egy transzkripció egységet alkotnak, ezt a feltevésünket RT-PCR kísérletekkel alá is támasztottam.

5. Reverz transzkripció kapcsolt Real-Time PCR segítségével vizsgáltam az operon transzkripciós aktivitását, különböző szénforrásokat tartalmazó tápoldatokon növesztett sejteken, illetve vizsgáltam kén jelenlétének hatását. A kapott eredmények alapján kijelenthetjük, hogy az *fhl* operon terméke az aminosav anyagcseréhez kapcsolt, valószínűleg az itt keletkező fölös redukáló erő eltávolítás a feladata. Kén jelenlétében aktivitása csökken, ez azzal magyarázható, hogy ebben az esetben alternatív útvonal nyílik meg a sejt redox egyensúlyának fenntartására.

6. A komplex egy fehérjéjét (FhIB) *E. coli*-ban túltermeltettem His-tag fúziós fehérje formájában, és nikkel kelátoló oszlopon tisztítottam. A tisztított FhIB fehérjével egy pár nyulat immunizáltam, poliklonális ellenanyag termelés céljából. Az anti-FhIB ellenanyagot tisztítottam, és azzal Western hibridizációs kísérleteket végeztem.

7. A Western hibridizációs kísérletekben kimutattam, hogy a komplex a sejtmembránban helyezkedik el, bár FhIB és valószínűleg vele együtt a komplex többi hidrofil karakterű eleme gyengén asszociált a membránhoz.

8. Hidrogenáz aktivitást mutattam ki *T. litoralis* membrán frakcióból mind felvevő, mint hidrogén fejlesztő irányban. A hidrogenáz felvevő aktivitás natív poliakrilamid gélben is detektálható volt.

9. Western hibridizációs kísérletekben sikerült kimutatni az FhIB fehérje jelenlétét natív poliakrilamid gélben ugyanabban a pozícióban ahol a hidrogenáz aktivitást volt. Ez és a CHT kromatográfia során történő együtt

tisztulás arra utal, hogy a membrán frakcióban jelen lévő hidrogenáz és a formát-dehidrogenáz egy komplexet alkot.

A dolgozat témájához szorosan kapcsolódó közlemények

Takács M., G. Rákhely, K.L. Kovács (2001) Molecular characterization and heterologous expression of hypCD, the first two [NiFe] hydrogenase accessory genes of *Thermococcus litoralis*. Arch Microbiol. 176(3): 231-235

M. Takács, G. Rákhely, K. L. Kovács Characterization of a putative respiratory complex in the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus litoralis*. Extremophiles 2002 The 4th International Congress on Extremophiles (2002) Szeptember 22-26, Nápoly, Olaszország

M. Takács, G. Rákhely, A. Tóth, K. L. Kovács Identification of *hypCD* genes encoding proteins involved in the maturation process of the NiFe hydrogenase in *Thermococcus litoralis*. 3rd International Congress on Extremophiles (2000) Szeptember 3-7, Hamburg-Harburg, Németország

M. Takács, G. Rákhely, K.L. Kovács Isolation of accessory genes, encoding proteins involved in the maturation process of the NiFe hydrogenase from *Thermococcus litoralis*. VIth International Conference on the Molecular Biology of Hydrogenases (2000) Augsztus 5-10, Berlin, Németország

M. Takács, B. Fodor, G. Rákhely, K.L. Kovács Identification of genes coding for proteins playing role in the maturation processes of thermophilic

NiFe hydrogenases Beyond the Genome, 18th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology (2000) Július 16-20, Birmingham, Egyesült Királyság

M. Takács, G. Rákhely, K.L. Kovács Hydrogenase related genes in *Thermococcus litoralis* Thermophiles '98 (1998) Szeptember 6-11, Brest, Franciaország

M. Takács, G. Rákhely, K.L. Kovács Hydrogene metabolism in a hyperthermophilic archaeon. Előadás: COST Action 841 Biological and Biochemical Diversity of Hydrogene Metabolism Workshop (2005) Május 1-3 Porto, Portugália

M. Takács, A. Tóth, G. Rákhely, K. L. Kovács Genes and proteins related to hydrogen metabolism in *Thermococcus litoralis*. Előadás az EU 5-ös keretprogram PYRED program találkozáson. (2002) Szeptember 22, Nápoly, Olaszország

További közlemények

K. L. Kovács, Cs. Bagyinka, L. Bodrossy, R. Csáki, B. Fodor, K. Gyórfi, T. Hanczár, M. Kálmán, J. Ősz, K. Perei, B. Polyák, G. Rákhely, **M. Takács**, A. Tóth, J. Tusz (2000) Recent advances in biohydrogen research. Pflügers Archiv Eur. J. Physiol. 439: R81-R83

Kovács K.L., Z. Bagi, Cs. Bagyinka, L. Bodrossy, R. Csáki, B. Fodor, T. Hanczár, J. Tusz, M. Kálmán, J. Klem, Á. Kovács, Jian Lu, M. Magony, G.

Maróti, K. Perei, B. Polyák, S. Arvani, **M. Takács**, A. Tóth, G. Rákhely (2000) Biohydrogen, Biogas, Bioremediation. Acta Biol. Debrecina. 22:47-54

C. Dahl, G. Rákhely, A.S. Pott-Sperling, B. Fodor, **M. Takács**, A. Tóth, M. Kraeling, K. Györfi, A. Kovács, J. Tusz, K. L. Kovács (1999) Genes involved in hydrogen and sulfur metabolism in phototrophic sulfur bacteria. FEMS Microbiology Letters 180: 317-324

K.L. Kovács, Cs. Bagyinka, H. Bratu, L. Bodrossy, B. Fodor, K. Györfi, T. Hanczár, M. Kálmán, J. Ósz, B. Polyák, G. Rákhely, **M. Takács**, A. Tóth, J. Tusz (1998) Environmental research in the “Universitas Biotechnology Laboratory” Acta Biologica Szegediense, 43: 111-116

Takács M., Rákhely G., Kovács L.K. Különc mikroorganizmusok (1998) Élet és Tudomány. LIII. /3: 79-81