

XXXI. OTDK Biológia Szekció

A kénanyagcsere és a hidrogén termelés kapcsolata *Thiocapsa roseopersicina* BBS-ben

Doffkay Zsolt

Biológus MSc II. évfolyam

Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi és
Informatikai Kar, Biotechnológiai Tanszék

Témavezetők:

Dr. Rákhely Gábor tanszékvezető SZTE TTIK Biotechnológiai tanszék

Tengölics Roland Doktorjelölt SZTE TTIK Biotechnológiai tanszék



2012



Tartalomjegyzék

Tartalmi összefoglaló	4
Rövidítések.....	5
Bevezetés.....	7
A fototróf bíbor kénbaktériumok.....	8
Modellorganizmusunk a <i>Thiocapsa roseopersicina</i> BBS	9
Kénanyagcsere fototróf bíbor kénbaktériumokban és <i>Thiocapsa roseopersicina</i> BBS- ben	10
Az elemi kén keletkezése és raktározása.	10
A tioszulfát felhasználása.	11
A szulfid felhasználása	12
Az elemi kén oxidálása szulfittá	12
A szulfid oxidációja.....	15
A hidrogenázok csoportosítása és általános jellemzése	16
A <i>Thiocapsa roseopersicina</i> BBS hidrogenázai.....	18
A Hup hidrogenáz	19
A Hox2 hidrogenáz	19
A Hyn hidrogenáz	19
A Hox1 hidrogenáz	20
A hidrogenázok anyagcsere kapcsolatai.....	20
A Hox típusú hidrogenázok anyagcsere kapcsolatai	20
A Hyn típusú hidrogenázok anyagcsere kapcsolatai	20
Célkitűzések	21
Anyagok és módszerek	22
Felhasznált törzsek	22
<i>E. coli</i> törzsek:.....	22
<i>T. roseopersicina</i> törzsek	22
Felhasznált primerek	23
Felhasznált plazmidok:	23
Növesztési körülmények	23
<i>E. coli</i> növesztési körülmények:	23
<i>T. roseopersicina</i> növesztési körülmények:.....	23
Kémiai kompetens sejt készítése	24

DNS manipulációs technikák	24
Genomi DNS izolálás <i>T. roseopersicina</i> -ból	24
Plazmid DNS tisztítás <i>E. coli</i> -ból	24
Agaróz gélelektroforézis	25
Fragment izolálás	25
PCR reakció	25
Restriktációs emésztés	26
PCR termék foszforilálása.	26
Emésztett vektor defoszforilálása (FastAP)	26
Ligálás	26
Transzformálás	26
Konjugálás	26
Mérési módszerek	27
<i>In vivo</i> hidrogén termelés mérése	27
<i>In vivo</i> kén-hidrogén termelés és szén-dioxid mérése	27
Tioszulfát, szulfid mennyiség meghatározása	28
Szulfát mennyiség meghatározása	28
Eredmények és megvitatásuk	29
Tioszulfát hatása a <i>T. roseopersicina</i> hidrogenázainak hidrogén termelésére	29
Elemi kén hatása a Hyn hidrogenáz hidrogéntermelésre	29
Kénvegyületek hatása az elemi kénen történő növesztés esetén	30
Szulfid hatása a Hyn hidrogén termelésére	30
Szulfid hatása a Hyn és Hox1 hidrogenázok hidrogén termelésére	31
Szulfid, mint kizárólagos elektron donor hatása a Hyn és Hox1 hidrogenázok hidrogéntermelésre	33
A <i>dsrS</i> gén mutagenezise	34
Összefoglalás	37
Köszönetnyilvánítás	40
Irodalomjegyzék	41
Nyilatkozat	46

Tartalmi összefoglaló

A fosszilis energiahordozók készleteinek elkerülhetetlen kimerülése miatt egyre nagyobb szerep jut a megújuló energiaforrások/energiahordozók kutatásának. Az új alternatív energiahordozók közül ki kell emelnünk a hidrogént, mivel égése során csak víz keletkezik, szén-dioxid nem. Előállítására az ipar is számos kémiai és fizikai módszert ismer. Biológiai úton történő előállítása új perspektívákat nyithat.

Régóta ismertek a hidrogenázok, mint metalloenzimek, melyek a protonok reverzibilis redukciójával képesek molekuláris hidrogént előállítani. Hidrogenáz alapú biohidrogén termelésre több megközelítés is létezik.

Ki kell emelnünk a bíbor kénbaktériumokat, melyek önmagukban szervesetlen szubsztrátokból képesek direkt fotobiohidrogén termelésre. Modellorganizmusunknak ezen egyedülálló tulajdonsága miatt választottuk a *Thiocapsa roseopersicina* BBS-t, amely a Chromatiaceae család tagja. Szénforrásként szén-dioxidot igényel, és képes különböző kénvegyületek felhasználni és a belőlük származó elektronokból fény segítségével hidrogént előállítani. Legalább négy aktív [NiFe] hidrogenázzal rendelkezik, melyek közül kettő szolubilis NAD^+ redukáló (Hox1, Hox2), és kettő membrán kötött periplazmatikus (Hyn, Hup). *In vivo* a Hox1 és Hyn enzimek reverzibilisek, a Hup pedig a hidrogén felvételét végzi. A hidrogén termelés hatékonyságának növelése érdekében meg kell ismernünk, hogy a kénvegyületek asszimilációja és a hidrogéntermelés milyen kapcsolatban vannak egymással.

Ezért megvizsgáltam, hogy a Hyn és Hox1 hidrogenázok hidrogén termelése hogyan kapcsolódik a kénanyagcseréhez. Vizsgáltam a különböző kénvegyületek különálló és együttes hatását az enzimek hidrogén termelésére, miközben követtem a különböző anyagcsere termékek és köztitermékek mennyiségi változását.

Kísérleteim során kimutattam, hogy a kénoxidáció során keletkező elektronokból a Hyn és Hox1 hidrogenázok képesek hidrogént termelni, tehát van kapcsolat a kénoxidáció és a hidrogéntermelés között. Továbbá megállapítottam, hogy elemi kén jelenlétében a hozzáadott szulfít hatására a Hyn hidrogén termelése megnövekszik, a Hox1 hidrogén termelése csökken. Eredményeim alapján modellt állítottunk föl a hidrogenázok és a kénanyagcsere kapcsolatára, melyben a kén oxidációjának és a szulfít asszimilációjának más-más szerepe van a hidrogenázok elektronokkal való ellátásában.

Kulcsszavak: kénanyagcsere, hidrogenázok, fototróf bíbor kénbaktérium, Hyn, Hox1

Rövidítések

AMP: adenzin-5'-monofoszfát

Amp: ampicilin

APS: adenzin-5'-foszfoszulfát

ATP: adenzin5'-trifoszfát

CN: cianid

CO: szén-monoxid

DMSO: dimetil-szulfoxid

dNTP: deoxiribonukleotid trifoszfát

Dsr: disszimilatív szulfít reduktáz

EDTA: etiléndiamin-tetraecetsav

Er: eritromicin

EtBr: etídium-bromid

Fcc: flavocitokróm c

FeFe: vas-vas hidrogenázok

GC: gázkromatográf

Gm: gentamicin

Km: kanamicin

NiFe: nikkel-vas hidrogenázok

OD: optikai denzitás

PC: Pfennig-féle tápoldat

PCR: polimeráz láncreakció

rpm: fordulatszám / perc

Sgp: kénglobulus fehérje

Sqr: szulfid kinon oxidoreduktáz

Str: sztreptomycin

TCD: hővezetőképesség detektor

Tris: trisz-(hidroximetil)-aminometán

Bevezetés

Napjaink egyik legnagyobb problémája, hogy jelenleg energiaigényünk legnagyobb részét nem megújuló energiaforrásokból fedezzük. Míg energiafelhasználásunk folyamatosan növekszik, addig a nem megújuló energiaforrások készletei kimerülőben vannak. Becslések szerint a fosszilis energiahordozók tartalékai még évtizedekig kitartanak, azonban kitermelésük fokozatosan gazdaságtalanabbá válik, ami az energia árak drasztikus emelkedését vonja maga után. Végül pedig a készletek kimerülésével új energiaforrásokat kell keresnünk. Megoldást jelenthet erre a problémára a megújuló energiaforrások hasznosítása. Bár részarányuk az energia-előállításban a fosszilis energiahordozókhoz képest folyamatosan növekszik, azonban jelenlegi részesedésük még mindig csekély.

A legígéretesebb megújuló energiaforrás Nap. A Napról a Földre érkező sugárzás több ezerszeresen meghaladja energiaigényünket. Ez az energia azonban nem egyenletesen érkezik hozzánk, hanem nagyon változó intenzitással. Emiatt tárolása egy igen fontos, máig nem kielégítően megoldott feladat. Ilyen szempontból ígéretes energiahordozó a molekuláris hidrogén, melynek égése során víz keletkezik, így az egyik, ha nem a legkörnyezetbarátabb energiahordozó.

Az ipar több módszert is ismer a hidrogén előállítására. Az egyik ilyen eljárás során vízgőzt és tisztított földgázt engednek át nikkel katalizátor felületen 800-950 °C-on. Ekkor hidrogén és szén-dioxid keletkezik ($\text{CH}_4 + 2 \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{CO}_2 + 4 \text{H}_2$). A szén és olaj oxidációjakor tiszta oxigénnel történő 1400 °C-os hevítés hatására a szén szén-dioxiddá oxidálódik, miközben hidrogén szabadul fel. Fontos megemlíteni továbbá a víz elektrolízisét, azonban az itt felhasznált villamos energia leggyakrabban fosszilis anyagok elégetéséből származik.

Ezen nem túl gazdaságos és környezetbarát módszerekre lehetne alternatív módszer a hidrogén biológiai úton történő termeltetése. Ebben igen fontos szerepe van a hidrogenáz enzimeknek, melyek molekuláris hidrogén előállítására képesek.

Létezik olyan megközelítés, ahol nem egész sejtes rendszereket használnának a folyamatban. Ebben az esetben mesterségesen utánozzák a vízbontás kémiai folyamatát. Megszintetizálják a hidrogenáz katalitikus doménjét, továbbá egy olyan molekulát mely képes elnyelni a fényt és a vízbontásból elektronokat juttatni a hidrogenázhoz. (Sun és mts, 2004).

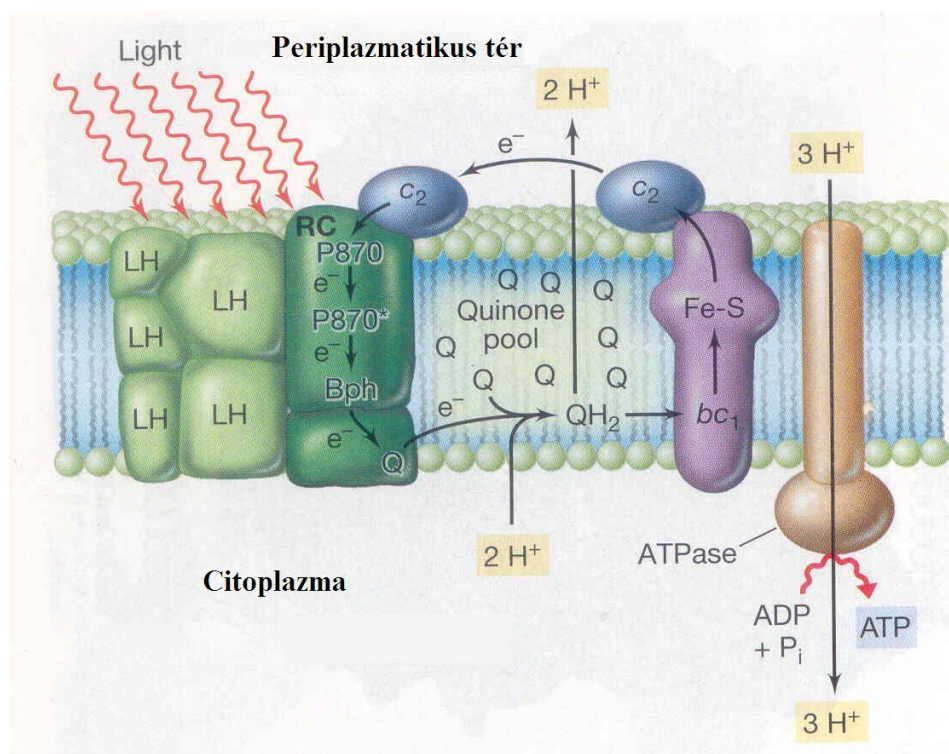
Lehetőségünk van azonban egész sejtes rendszerek használatára is. Egyik, hogy a már meglévő biomasszából sötét fermentációval állítunk elő hidrogént. Ekkor közvetve a napfény energiáját hasznosítjuk (Kovács és mts, 2006). Közvetlenül is tudjuk a napfény energiáját hasznosítani. Ezt megtehetjük algákkal, melyekben a fotoszintetikus vízbontásból származó elektronok továbbíthatnak hidrogenáz enzimekre. Azonban a vízbontás során keletkező oxigén gátolja a hidrogenázok működését és expresszióját (Sawers, 1999). Továbbá az algákat kénmentes tápra kell helyezni, így a folyamat kétlépcsősé válik, és hosszú távon nehezen fenntartható (Kovács és mts, 2006).

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 az organizmus által használt szervesetlen kénvegyületek olcsó alapanyagok (Frigaard és Dahl, 2009).

A fototróf bíbor kénbaktériumok

Ezen baktériumok igen nagy ökológiai jelentőséggel rendelkeznek a kén ciklikus körforgásában, mivel a szerves anyagok bontásából származó szulfidot képesek szulfáttá oxidálni. Élőhelyükön a fény és a szulfid fordított koncentrációban fordul elő. Minél mélyebben vagyunk, annál több szulfid áll rendelkezésre, mely a szerves anyagok anaerob lebontásából származik, azonban csökken az ezen rétegekbe jutó fény intenzitása. Ezért a fototróf bíbor kénbaktériumok növekedése egy viszonylag szűk zónára korlátozódik. Ebben a zónában mind fény, mind szulfid rendelkezésre áll, és nincs, vagy nagyon minimális az oxigén jelenléte (Frigaard és Dahl, 2009).

II-es típusú fotoszintetikus rendszerrel rendelkezik, azonban ebből hiányzik a vízbontó komplex, így nem tudja fotoszintetikus rendszerének elektron igényét ebből a lépésből fedezni (Frigaard és Dahl, 2009). A bíbor kénbaktériumok rendelkeznek ciklikus elektron transzporttal, melyhez ciklikus ATP szintézis kapcsolódik, amit ciklikus fotofoszforilációnak neveznek. Ennek során a gerjesztett bakterioklorofill molekula elektronja menakinonra, majd innen ubikinonra kerül. Az ubikinolt (redukált ubikinon) a citokróm bc₁ komplex oxidálja, és ennek során protonok pumpálódnak a citoplazmából a periplazmába. Az így kialakuló protongrádiens működteti az ATP szintáz enzimet. Végül



1. ábra A bíbor kénbaktériumok ciklikus elektron transzportjának strukturális vázlata
(Madigan és Martinko, 2009)

pedig a citokróm2 molekula visszaszállítja a bakterioklorofillre az elektront (Madigan és Martinko, 2009). (1. Ábra)

Modellorganizmusunk a *Thiocapsa roseopersicina* BBS

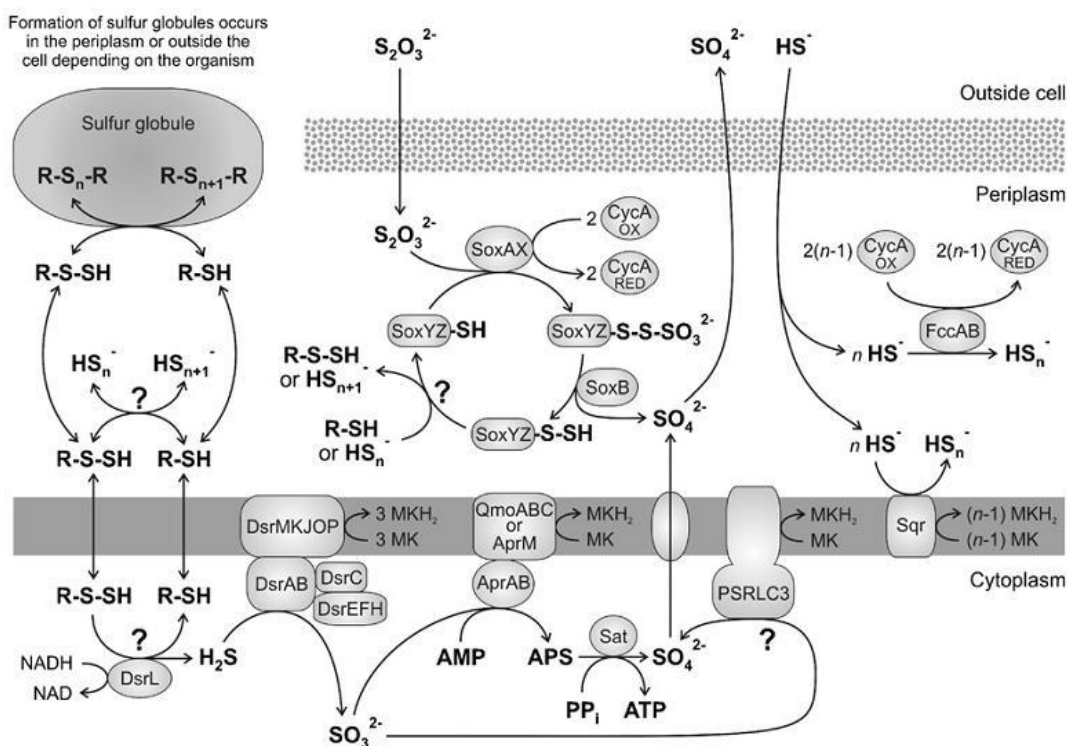
A *T. roseopersicina* egy fototróf bíbor kénbaktérium. Eredetileg a Jeges tenger 14 °C-os vizéből izolálták (Bogorov és mts, 1974). Mind fotoautotróf, fotoheterotróf, és mixotróf módon képes növekedni és szaporodni. Ez nem meglepő, mivel eredeti élőhelyén a folyamatosan változó oxigénkoncentrációnak, a változó hőmérsékletnek és kénkoncentrációnak köszönhetően változatos anyagcsere utakkal rendelkezik.

Laboratóriumi körülmények között 26-29 °C az optimális növekedési hőmérséklete. Folyadékkultúrában 5-6 nap alatt nő fel, lemezen körülbelül 2 hét alatt képez telepeket.

Növekedése során képes a kénvegyületek oxidációjából származó elektronokat használni a karbonát fixációhoz, de szerves anyagokat és molekuláris hidrogént is felhasználhat. Nitrogén limitált környezetben nitrogenáz enzimével nitrogénfixációra is végezhet. Képes oxigén jelenlétében is növekedni, azonban ekkor nem végez fotoszintézist, mivel az oxigén gátolja a pigmentszintézisét (Kovács és mts, 2003).

Kénanyagsere fototróf bíbor kénbaktériumokban és *Thiocapsa roseopersicina* BBS-ben

A bíbor kénbaktériumok nem képesek víz bontására, ezért fotoszintetikus elektrondonorként leginkább különböző kénvegyületeket használnak (2. ábra). A csoport összes tagja képes a szulfid és az elemi kén felhasználására (Frigaard and Dahl, 2009). A metabolikusan kevésbé specializált fajok ezen kénvegyületek mellett képesek tioszulfátot, molekuláris hidrogént, és szerves vegyületeket is hasznosítani (Frigaard and Dahl, 2009). Az alábbiakban ismertetem a kénvegyületek oxidálásának folyamatát a legredukáltabb szulfidtól a legoxidáltabb szulfátig. A kénoxidálás folyamatát legintenzívebben *Allochromatium vinosum*ban tanulmányozták, mely organizmus közeli rokonságban van modellorganizmusunkkal. A következőkben leírt folyamatokban szereplő gének kivétel nélkül a *T. roseopersicina* genomjában is megtalálhatóak.



2. ábra A fototróf bíbor kénbaktériumok kénanyagszerjének áttekintése (Frigaard és Dahl, 2009)

Az elemi kén keletkezése és raktározása.

A bíbor kénbaktériumok szulfid, polisulfid, tioszulfát és elemi kén felhasználása esetén elemi ként raktároznak közti-termékként (Frigaard and Dahl, 2009). Ez történhet extracellulárisan (Ectothiorhodospiraceae), vagy intracellulárisan a periplazmatikus térben

(Chromatiaceae). *A. vinosum*-ban és *T. roseopersicina*-ban vizsgálták a kénglobulusok kialakításában részt vevő fehérjéket (Prange és mts., 2004). Az előbbi organizmusban 3 fehérjét azonosítottak (SgpA, SgpB és SgpC), míg az utóbbiban két fehérjét sikerült kimutatni (SgpA, SgpC). Az aminosav szekvenciák vizsgálata során megállapították, hogy az *A. vinosum* SgpA és SgpB fehérjei és a *T. roseopersicina* SgpA fehérjeje homológok, és ugyanez a helyzet az SgpC fehérjék esetén is. Az SgpC fehérje hiányában a kénglobulusok mérete jelentősen csökkent, ugyanakkor a kénvegyületek felhasználásának kinetikája nem változott. Ebből arra következtettek, hogy az SgpC fehérjéknek a globulusok méretének növelésekor van szerepük (Prange és mts., 2004). Az Sgp fehérjék pontos szerepe még nem ismert, fontosságuk azonban vitathatatlan, mivel a sejt összfehérjéinek 3,5 %-át is kitehetik, és vélhetően strukturális szerepük van a kénglobulusok kialakulásakor. Erre utal, hogy más egyéb struktúrfehérjékkel mutatnak hasonlóságot.

A tioszulfát felhasználása.

A tioszulfát felhasználásának két lehetséges útvonalát azonosították *A. vinosum*-ban. Ezek közül az egyik végterméke tetratiónt, míg a másik útvonal végterméke szulfát. A tetratiónt két tioszulfát molekula oxidatív kondenzálásával keletkezik, 2 elektron felszabadulása mellett és a tioszulfát dehidrogenáz enzim katalizálja (TsdA). Ez a reakció igen elterjedt a mikroorganizmusok között, és különösen nagy a jelentősége a savtűrő élőlények között mivel ebben a pH tartományban a tetratiónt stabilabb, mint a tioszulfát. Az *A. vinosum*-ban leírt TsdA fehérje egy 25.8 kDa-os periplazmatikus citokróm c típusú molekula. Két hem csoportot köt, melyekben a vas atomok koordinálásában hisztidin és cisztein vesz részt, mely azon fehérjékre jellemző, amik a kénanyagcserében vesznek részt (Denkmann és mts., 2012).

Az *A. vinosum*-ban feltárt másik tioszulfát felhasználási útvonal a periplazmatikus Sox enzimrendszerhez kapcsolódik (Hensen és mts., 2006). Modellorganizmusunkban az általunk használt növesztési körülmények között ez az útvonal az abszolút domináns. Ekkor kénglobulusok keletkeznek közti-termékként. A tioszulfát felhasználása során a molekula először kapcsolódik a SoxYZ heterodimer fehérje komplexben a SoxY fehérje konzervált cisztein aminosavához. Ezt a két elektron felszabadulásával járó folyamatot a SoxXA fehérjék katalizálják. Ezután a SoxB fehérje hidrolitikusan lehasítja a terminális kénmolekulát szulfát formájában. Az így hátramaradt SoxY-hoz kapcsolódó perszulfid molekula ezután a kénglobulusba szállítódik, ezáltal regenerálódik a SoxY fehérjét és a

folyamat megismétlődhet. A SoxY regenerálásában a SoxL fehérje játszik szerepet (Welte és mtsai, 2009) (2. ábra)

Azon mikroorganizmusok, melyek rendelkeznek a SoxCD fehérjéket kódoló génekkel, képesek a tioszulfátot köztes kénglobulus képzés nélkül szulfáttá alakítani (Zander és mts, 2011). Ekkor a Sox enzimszisztéma a tioszulfát két eltérő oxidációs állapotú kénmolekuláját (+5, -1) szulfáttá oxidálja. A kénglobulust nem képző mikroorganizmusok a SoxY perszulfid molekulán található terminális ként szulfáttá oxidálják Sox(CD)₂ fehérjekomplexükkel. Az így keletkezett SoxY tioszulfonát molekulát a SoxB fehérje hidrolitikusan hasítja egy szulfáttá és az eredeti SoxY fehérjévé (Hensen és mts., 2006). Az *A. vinosum* és *T. roseopersicina* nem rendelkezik ezen fehérjékkel, így a tioszulfát felhasználás során kénglobulusokat képeznek. A tioszulfát felhasználása kénglobulust nem képző organizmusokban 8 elektront szolgáltat, míg a kénglobulus képzés esetén csak 2 elektron szabadul fel a Sox enzimszisztéma működése révén, és a maradék 6 elektront az elemi kén további oxidálása szolgáltatja.

A szulfid felhasználása

A szulfid felhasználását a flavocitokróma c (Fcc) és szulfid kinon oxidoreduktáz (Sqr) enzimek végzik (2. ábra). Ezen enzimek a felszabaduló elektronokat a fotoszintetikus elektrontranszport láncba juttatják, míg a keletkező kén a kénglobulusokba kerül. Az Fcc egy nagyobb katalitikus (FccA), és egy kisebb elektron transzportban szerepet játszó (FccB) fehérjéből felépülő periplazmatikus enzim. A szulfid elemi kénné oxidálását az FccA alegység végzi. A keletkező elektronok az FccB által kötött citokróma-c molekuláról a kinon raktárba jutnak. Az Sqr egy membrán kötött enzim, aktív helyével a periplazma felé néz. A szulfid átalakítása során az elektronokat FAD kofaktorának segítségével közvetlenül a kinon raktárba juttatja. *T. roseopersicina*-ban két különböző csoportba tartozó *sqr* gén található. Egyik egy SqrD típusú fehérjét kódol, míg a másik a zöld kénbaktériumokra jellemző fehérjével homológ Sqn-nek elnevezett SqrF típusú fehérjét kódol (Gregersen és mts, 2011).

Az elemi kén oxidálása szulfáttá

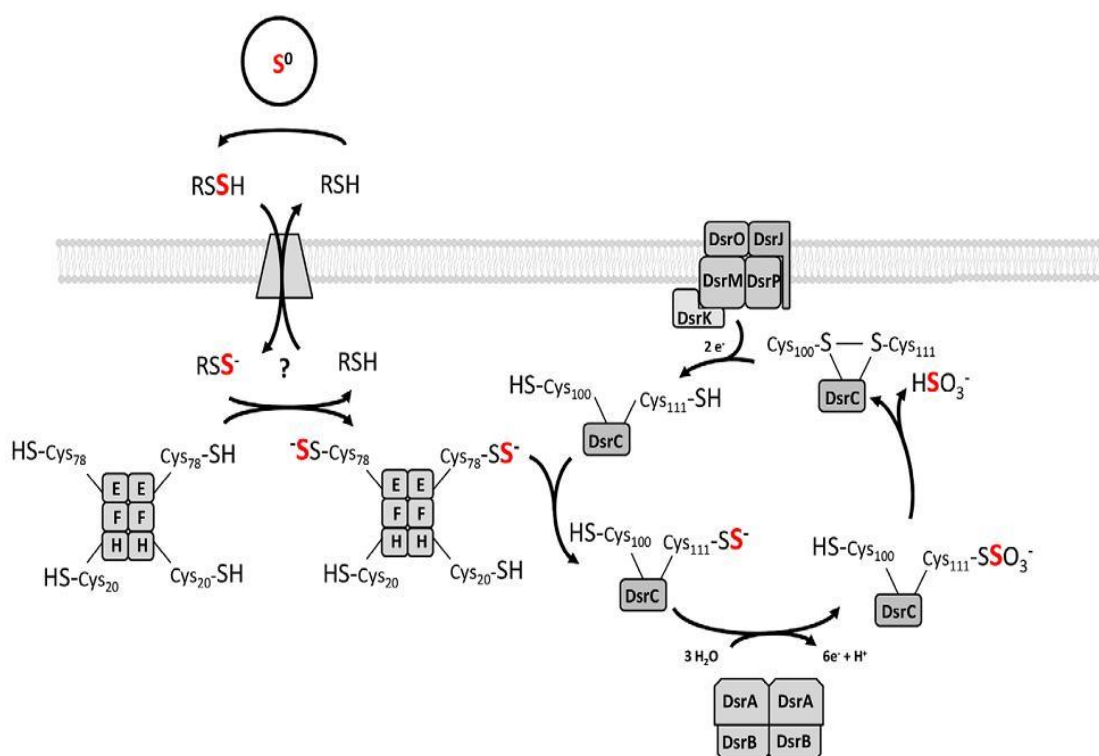
A kénglobulusokban raktározott elemi kén ezt követően szulfáttá oxidálódik. Ezt a 4 elektron keletkezésével járó folyamatot a disszimilatív típusú szulfid reduktáz (Dsr) katalizálja. Ez az enzim család általánosan előfordul a kénoxidáló és szulfidredukáló

organizmusokban is. Utóbbi esetben a szulfit szulfiddá alakítását katalizálja, míg jelen esetben az ellenkező irányú reakciót. A Dsr enzimszisztéma katalitikus részét a *dsrA* és *dsrB* gén által kódolt fehérjék alkotják. *A. vinosum*-ban ezen génektől 3' irányban, velük egy operonban további gének találhatók, melyekről bizonyított, hogy nélkülözhetetlen szerepük van az elemi kén oxidálásában (Pott és Dahl, 1998; Dahl és mts., 2005). Ebben az organizmusban az operon a következőképpen épül fel: *dsrABEFHCMKLJOPNRS*. A *dsr* operon bizonyos tagjai mind kénoxidáló mind kénredukáló mikroorganizmusokban megtalálhatóak. Ezek a gének alkotják az operon „magját”, és az általuk kódolt fehérjék mind a szulfit oxidációjában mind a kén oxidálásában részt vesznek. Ezek a következők a *dsrAB* mellett: a *dsrC*, a *dsrMKJOP* és a *dsrN*. A *dsrEFH* és *dsrL* gének a kénoxidáló, míg a *dsrD* gén a kénredukálókra jellemző. Az operon tagjai közül a DsrAB fehérjével együtt sikerült tisztítani a DsrC fehérjét a DsrEFH és DsrMKJOP komplexet is *A. vinosum*-ban (Dahl és mts., 2005). Ez a *dsr* operon génei által kódolt fehérjék nagyon szoros együttműködésére utal, azonban a kénoxidáció folyamatát még nem sikerült minden lépésében tisztázni

A *dsrR* és *dsrS* gének nem általánosak a kénoxidáló organizmusok körében. Nem feltétlenül egy operonban találhatóak a többi *dsr* génnel, és nem is találhatóak meg minden organizmusban. *A. vinosum*-ban kimutatták, hogy mind a DsrR-nek (Grimm és mts., 2010), mind a DsrS-nek (Grimm és mts., 2011) az operon génjeinek poszttranszkripciószabályozásában van szerepe.

A Dsr enzimszisztéma katalitikus része a citoplazmában helyezkedik el. Ahhoz, hogy a periplazmatikusan tárolt kénglobulusokban lévő elemi kén ezen enzim számára hozzáférhetővé váljon, szükség van a belső membránon keresztüli transzportra. A szállító molekula illetve a transzport folyamata máig nem ismert. Feltételezik, hogy a szállításban kis molekulásúlyú tiol csoportot tartalmazó molekulák vehetnek részt. A DsrC és DsrEFH fehérjék homológiát mutatnak az *E. coli*-ban leírt TusA és TusBCD fehérjékkel (Cort és mts., 2008). Utóbbiak egy kén-továbbító rendszert alkotnak, mely a tiouridin szintézisben vesz részt. A Dsr EFH fehérjék egy $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ szerkezetű szolubilis heterohexamer komplexet alkotnak (Dahl és mts., 2008). *In vitro* bizonyították, hogy a DsrE fehérje konzervált 78-as cisztein aminosava képes a szulfid kénjét megkötni, majd azt a DsrC fehérje konzervált 111-es cisztein oldalláncára továbbadni (Stockdreher és mts., 2012). *In vitro* a folyamat csak ebben az irányban játszódott le. A DsrC molekula konzervált cisztein aminosava a fehérje C terminális végén található, mely az NMR kísérletek alapján

önmagában egy rendezetlen struktúrát alkot. Valószínű, hogy ez a flexibilis C terminális kar egy másik molekulával kapcsolatba lépve nyeri el stabil konformációját. *Desulfovibrio vulgaris*ban sikerült a DsrAB fehérjét a DsrC fehérjével együtt tisztítani (Oliveira és mts, 2008). Ebben a komplexben a DsrC molekula C terminális vége a DsrA és DsrB fehérje között kialakuló árokszerű struktúrába nyúlt be. Ennek fényében vélhetően hibás volt az eredeti feltételezés, hogy a DsrAB enzim szubsztrátja a helyben felszabaduló kén-hidrogén és úgy tűnik, hogy a valódi fiziológias szubsztrát egy fehérje kötött perszulfid molekula. Amennyiben a DsrC köti a kénoxidáló enzim szubsztrátját *in vivo*, akkor lehetséges, hogy a keletkező szulfit egy diszulfid híd kialakulása által hasad le (Cort és mts, 2008). *D. vulgaris*ban megfigyelték, hogy amikor a DsrC kapcsolódik a DsrAB fehérjéhez, akkor a 100-as és 111-es pozícióban lévő cisztein oldalláncok megfelelően közel kerülnek egymáshoz, hogy közöttük diszulfid híd kialakulhasson. A fordított irányú reakció jól ismert és pH 7 fölött reverzibilis: $RS-SR+SO_3^{2-} \rightarrow RS- + RS-SO_3^{2-}$ (Cort és mts, 2008).



3. ábra A Dsr enzimrendszer működésének legújabb modellje (Stockdreher és mts, 2012)

A DsrMKJOP fehérjék homológjait megtalálták *Archeoglobus. fulgidus*ban és *D. vulgaris*ban is (Sander és mts, 2006), és minden esetben hasonló tagok építik fel a komplexet. A komplex vélhetően elektron transzport feladatot tölt be a Dsr enzim működésében. Tagjai között található egy periplazmatikus citokróm c alegység (DsrJ), egy periplazmatikus vas-kén kockákat tartalmazó alegység (DsrO), egy integráns membrán

fehérje (DsrP), egy másik membrán kötött fehérje, mely vélhetően hem b-t tartalmaz (DsrM) és egy citoplazmatikus vas-kén kockákat tartalmazó fehérje (DsrK). A DsrK továbbá hasonlóságot mutat archeakból izolált heterodiszulfid reduktázokkal, a komplex vélhetően képes a kénoxidációból származó elektronokat a fotoszintetikus elektrontranszport lánchoz juttatni (Sander és mts, 2006).

A szulfít oxidációja

A szulfít egy igen reaktív vegyület. Ennek fényében nem meglepő, hogy a szulfít oxidálásának képessége igen elterjedt az élővilágban. A bíbor kénbaktériumok kétféle módon képesek a szulfítot szulfáttá oxidálni. Az egyik a szulfít egy lépéses, direkt oxidációja, mely általában, de nem kizárólagosan a periplazmatikus térben zajlik. A másik útvonal, azonban egy több lépéses folyamat, mely AMP-t igényel, és a citoplazmában játszódik le (2. ábra).

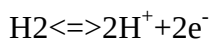
A direkt oxidációs útvonalat egy oxidoreduktáz típusú enzim katalizálja, mely vélhetően molibdént tartalmaz (Kappler és Dahl, 2001).

Az AMP függő útvonal esetén először a szulfít aktiválására van szükség. Ekkor az adenilil-szulfát-reduktáz egy AMP-ből és szulfítból adenilil szulfátot (APS) képez, és 2 elektron szabadul fel, melyek sorsa nem ismert, de lehetséges, hogy a sejt kinonraktárába jutnak. Ekkor egy nagy energiájú kötés alakul ki (Sánchez és mts, 2001). Ezután két lehetőség van. Az APS AMP csoportja kapcsolódhat mind pirofoszfáttal, mind foszfáttal. Előbbi reakciót az ATP szulfuriláz katalizálja, és a szulfát mellett ATP keletkezik. Utóbbi reakciót az adenililszulfát-foszfát adenililtranszferáz enzim katalizálja, és a szulfát mellett ADP keletkezik, melyek ezután az adenilát kináz AMP-vé és ATP-vé alakít (2. ábra) (Kappler és Dahl, 2001).

Ugyan a direkt oxidációs útvonal esetén nem keletkezik ATP, azonban mégis ez az útvonal tűnik elterjedtebbnek (Sánchez és mts, 2001; Kappler és Dahl, 2001).

A hidrogenázok csoportosítása és általános jellemzése

A hidrogén metabolizmus kulcsenzime a hidrogenázok, melyek az alábbi reverzibilis reakciót katalizálják:



A hidrogenázok *in vitro* körülmények között mindkét irányban képesek a reakciót katalizálni. Elektron donorok jelenlétében a hidrogén képződését (hidrogén termelés / hydrogen evolution), míg elektron akceptorok jelenlétében a hidrogén oxidálását (hidrogén felvétel / hydrogen uptake) katalizálják. *In vivo* körülmények között aktivitásuk a sejt redoxpotenciáljától függ. Egy sejt több különféle hidrogenázt is tartalmazhat. A hidrogenázok általában érzékenyek a környezeti tényezőkre (oxigén, hőmérséklet), és bizonyos anyagok (CO, CN-) jelenlétére és az aktív enzim kialakításához több kisegítő fehérje közreműködése szükséges, ami jelentősen nehezíti ipari felhasználásukat (Maróti és mts, 2003).

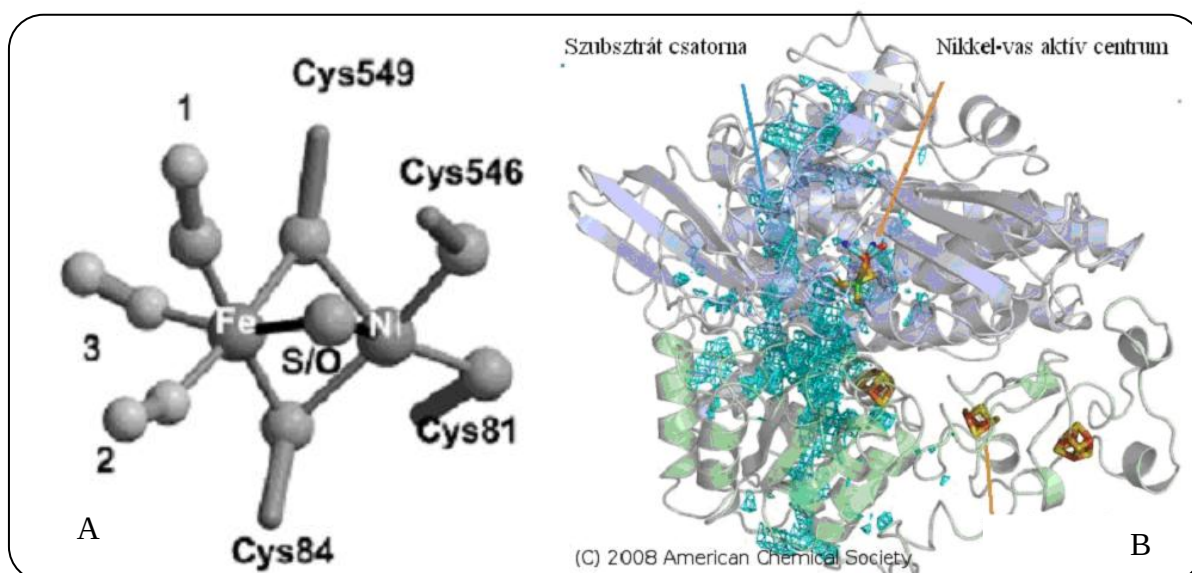
A hidrogenázok csoportosítása általában aktív centrumuk fémtartalma alapján történik. Ennek megfelelően megkülönböztetünk vaskén kocka mentes (Fe), vas-vas [FeFe] és nikkel-vas [NiFe] hidrogenázokat. Ezen enzimek különböző evolúciós fejlődési ágak képviselnek, és nem mutatnak egymással hasonlóságot (Vignais és Billoud, 2007)

A vaskén kocka mentes (Fe) hidrogenázok metanogén archeakban fordulnak elő. Ugyan aktív centrumuk nem tartalmaz fématomot, azonban kofaktorként egy vastartalmú molekulát igényelnek katalitikus aktivitásukhoz. A vas atom azonban redox szempontból nem aktív (Zirngibl, és mts, 1990).

A vas-vas [FeFe] hidrogenázok két vasatomot tartalmaznak aktív centrumukban. Egyedülként a hidrogenázok közül eukariótákban is előfordulnak. Monomerként illetve több alegységes enzimként is megtalálhatóak. Hidrogéntermelő aktivitásuk meghaladja a [NiFe] hidrogenázokét, azonban érzékenyebbek oxigén jelenlétére, és expressziójuk, illetve érésük is kevésbé ismert, mint az utóbbi csoporté, ezért biotechnológia felhasználásuk jelenleg kevés előnnyel jár. A nikkel-vas [NiFe] hidrogenázokkal ellentétben méretük tág határok között változhat. A katalitikus aktivitáshoz elengedhetetlen 350 aminosav hosszúságú domén alkotja az enzim magját, azonban a molekula ezen kívül több domént is tartalmazhat. A két központi fématom egy vas-kén

kockához kapcsolódik és mindkettőhöz CO és CN ligandok kapcsolódnak (Vignais és Billoud, 2007).

A nikkel-vas [NiFe] hidrogenázok esetében nagyszámú háromdimenziós szerkezet áll rendelkezésünkre, így szerkezetük sokkal ismertebb, mint a [FeFe] hidrogenázoké. A nikkel-vas hidrogenázok heterodimer szerkezetűek. A kis alegység átlagosan 30 kDa méretű, és az elektrontranszportban szerepet játszó vaskén kockákat tartalmaz (4. ábra B), míg a nagy alegység átlagosan 60 kDa méretű és ez tartalmazza a katalitikus heterobinukleáris fémkomplexet (4. ábra A). A fématomok koordinálásában nélkülözhetetlen szerepet játszik a nagy alegységben található C-X-X-C motívum. A két-két konzervált cisztein közül az egyik csak a nikkel atomhoz, míg a másik mind a nikkel, mind a vas atomhoz kapcsolódik. A vas atom rögzítésében emellett a sejtek számára egyébként toxikus CO és két CN- ligand is részt vesz. (Vignais és Billoud, 2007).



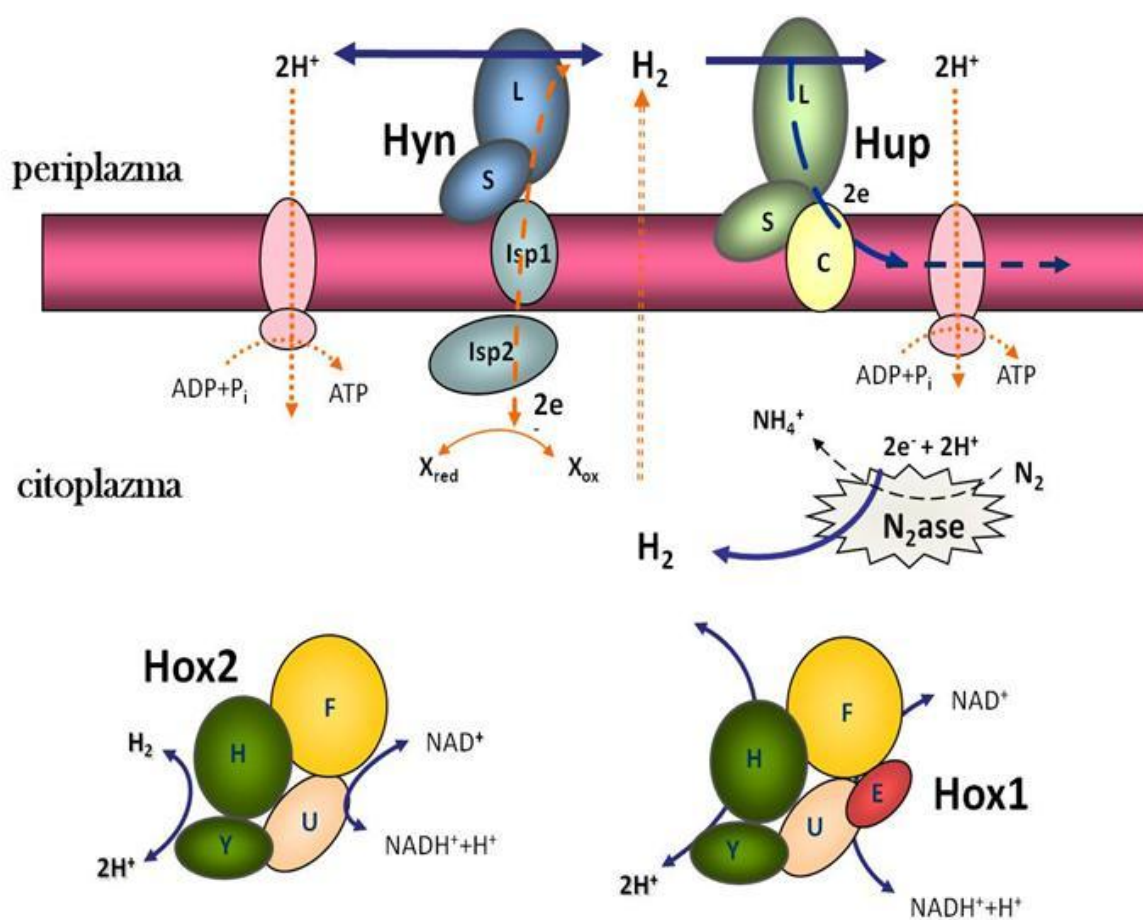
4. ábra A: A nikkel vas heterobinukleáris aktív centrum felépítése. Az 1-es és 2-es számmal jelölt ligaondok a cianod molekulák, míg a 3-as a szénmonoxid. B: A *Desulfovibrio vulgaris* [NiFe] hidrogenázának háromdimenziós szerkezete. (Fontecilla-Camps és mts., 1997)

A hidrogenáz aktív centruma az enzim felszínétől távol helyezkedik el. A molekuláris hidrogén hidrofób csatornákon keresztül jut el az aktív centrumhoz. A kívülről érkező elektronok számára a vaskén kockák jelentik a szállítási útvonalat. A protonok számára kísérletesen eddig 2 csatornát írtak le (Dementin és mts, 2004; Szőri-Dorogházi és mts, 2012).

Ezen hidrogenázok érése igen összetett, több lépcsős folyamat. Számos kisegítő fehérje vesz részt benne. Egyesek esszenciálisak minden hidrogenáz összeszerelődéséhez

(Maróti és mts, 2003), míg mások specifikusak egy-egy enzimre. A folyamat során beépül a fehérjébe a heterobinukleáris fémcentrum, majd az ehhez kapcsolódó ligandok. A folyamat végén egy specifikus endopeptidáz lehasít egy szakaszt a fehérje C terminális végéről. Ezután a kis és nagy alegység összeszerelődik és a hidrogenáz aktívvá válik (Maróti és mts, 2010).

***A Thiocapsa roseopersicina* BBS hidrogenázai**



5. ábra *A Thiocapsa roseopersicina* hidrogenázai

A. T. roseopersicina legalább 4 különböző aktív hidrogenázt tartalmaz (5. ábra). Ez valószínűleg annak köszönhető, hogy mind fotoautotróf, mind fotoheterotróf, mind heterotróf metabolizmusra képes. Ezek a hidrogenázok különböznek sejten belüli lokalizációjukban, stabilitásukban és funkciójukban egyaránt. (Kovács és mts, 2005; Maróti és mts, 2010).

A Hup hidrogenáz

A Hup hidrogenáz egy membránkött hidrogenáz, mely a periplazma felől kapcsolódik a membránhoz. Feladata, melyről a nevét is kapta (hydrogen uptake), a hidrogén felvétele a környezetből, például a nitrogén fixálás során keletkező molekuláris hidrogént képes újrahasznosítani, illetve egyéb forrásból származó molekuláris hidrogén felvételével plusz redukáló erőt biztosít a sejtnak. A *hupSLCDHIR* operon által kódolt. Ezen gének közül a *hupS* és *hupL* a kis és nagy alegység génjeit kódolják. A *hupDHIR* gének a hidrogenáz szabályozásában és érésében játszanak szerepet. Míg a *hupC* génről bizonyították, hogy az általa kódolt fehérje az enzim elektron transzportjában játszik szerepet és részt vesz a membránhoz horgonyzásában is (Palágyi-Mészáros és mts., 2009).

A Hox2 hidrogenáz

Ez a hidrogenáz egy szolubilis NAD^+ redukáló enzim. A *hoxHYUF* operon által kódolt és tetramer szerkezetet mutat. A *hoxH* és *hoxY* a kis és nagy alegység, míg a *hoxU* és *hoxF* a diaforáz alegységet kódolja. Aktivitását csak glükóz jelenlétében sikerült kimutatni (Maróti és mts., 2010).

A Hyn hidrogenáz

A Hyn hidrogenáz a Hup hidrogenázhoz hasonlóan periplazmatikus, a sejtmembránhoz kapcsolódva helyezkedik el. Nagyon ellenálló hővel, proteázokkal és oxigénnel szemben. A *T. roseopersicina* növekedési hőmérsékleténél magasabb hőmérsékleten a legaktívabb (Kovács és mts, 1988).

In vivo mind a hidrogén felvételét mind a hidrogén termelését képes katalizálni. A *hynSisp1isp2hynL* operonban kódolt. Itt a kis és nagy alegységet kódoló *hynS* és *hynL* géneket két fehérje kódoló szekvencia szakítja meg *isp1-isp2* (Rákhely és mts, 1998). Ez a szokatlan génelrendeződés a Chromatiaceae család más tagjainál is megfigyelhető (Dahl és mts, 1999). Ezekről bizonyították, hogy szükségesek az *in vivo* működéséhez, feltehetőleg elektron transzport szerepük van, mivel hiányuk az *in vitro* enzimaktivitást nem befolyásolja (Palágyi-Mészáros, 2009). Az *isp1* és *isp2* fehérjék hasonlóságot mutatnak a DsrK és DsrM fehérjékkel (Dahl és mts, 1999).

A Hox1 hidrogenáz

A Hox1 hidrogenáz szolubilis enzim és a reverzibilis, NAD^+ redukáló hidrogenázok osztályába tartozik. A *hox1EFUYH* operonban kódolt gének alkotják (Rákhely és mts, 2004). A cianobaktériumokban található hidrogenázokhoz hasonlóan heteropentamer szerkezetet alkot. A *hox1Y* és *hox1H* a kis és nagy alegység génjeit, a *hox1F* és *hox1U* a diaforáz alegységet, míg a *hox1E* egy vélhetően az elektron transzportban szerepet játszó fehérjét kódol (Palágyi-Mészáros és mts, 2009). *In vivo* körülmények között mind hidrogén felvételre, mind hidrogéntermelésre képes, a sejt redox állapotától függően (Rákhely és mts, 2007).

A hidrogenázok anyagcsere kapcsolatai

A Hox típusú hidrogenázok anyagcsere kapcsolatai

A Hox1 enzim hasonlóságot mutat a cianobakteriális reverzibilis NAD^+ redukáló hidrogenázokkal. Ez tükröződik mind a fehérje szekvenciájában, mind a heteropentamer szerkezetében. Képes fényben különböző kénvegyületekből hidrogént termelni, továbbá sötétben szerves szubsztrátok fermentációjából is. Az enzim képes a hidrogén felvételre is nitrogénfixáló körülmények között, illetve magas tioszulfát koncentráció esetén széndioxid jelenlétében. (Rákhely és mts, 2007)

A Hyn típusú hidrogenázok anyagcsere kapcsolatai

Archeákban (Laska és mts, 2003) és eubaktériumokban (Guiral és mts, 2005; Dietrich és Klimek, 2002) is leírtak már olyan anyagcsere útvonalat, mely az elemi kén redukálását szolgálja a hidrogénből származó elektronokkal. Ezen komplexeknek legalább 3 tagja van. Ezek közül az egyik a *T. roseopersiciná*-ban is megtalálható periplazmatikus Hyn típusú hidrogenáz. *Wolinella succinogenes*-ben a hidrogenáz mellett a formát-dehidrogenáz enzim is szolgáltatja az elektronokat a reakcióhoz (Dietrich és Klimek, 2002). Az elemi kén, vagy poliszulfid redukcióját egy poliszulfid reduktáz katalizálja. Ezen enzim génjének homológjai a *T. roseopersiciná*-ban is megtalálhatóak. A hidrogenáz és a kénreduktáz közötti elektron transzport protonok transzlokációjához kapcsolódhat. Így ez a kénlégzés képes a sejteknek energiát szolgáltatni, mivel a kialakuló protongrádiensben tárolt energia ATP szintézisre fordítható *Archeoglobus fulgidus*-ban és *W. succinogenes*-ben (Dietrich és Klimek, 2002; Laska és mts, 2003).

Célkitűzések

Munkám során célul tűztük ki, hogy megvizsgáljam a *Thiocapsa roseopersicina* Hyn és Hox1 hidrogenázainak hidrogén termelését különböző kénvegyületek jelenlétében. Megválaszoljam, hogy a Hyn hidrogenáz a kénanyagcsere melyik lépéséből kaphat elektronokat fiziológias körülmények között.

Összehasonlítsam a Hyn hidrogenáz hidrogén termelését a Hox1 hidrogén termelésével. Kövessem a hidrogén termelés ideje alatt a különböző kénvegyületek mennyiségének változását, és ez alapján szolgáljak információkkal a hidrogéntermelés és a kénanyagcsere kapcsolatának mechanizmusáról.

Célom volt továbbá, hogy az így kapott adatokból elektrontranszport modellt állítsak fel a két hidrogenáz és a kénanyagcsere kapcsolatára vonatkozóan, majd eredményeimet molekuláris biológiai módszerekkel is megerősítsem.

Anyagok és módszerek

Felhasznált törzsek

Név	Genotípus	referencia
<i>E. coli</i> törzsek:		
NOVA BLUE	<i>recA1 gyrA96 (F' lacI^q Z) Tc^r</i>	Novagene
S17-1 lambda pir	294 (<i>recA pro res mod</i>) Tpr Smr (pRP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7)	Herrero és mts.,1990
<i>T. roseopersicina</i> törzsek		
BBS	vad típus	Bogorov,1974
GB2131	<i>ΔhupSL, ΔhoxH Er^r Gm^r</i>	Rákhely és mts., 2004
GB1121	<i>ΔhupSL, ΔHynSL Sm^r Gm^r</i>	Rákhely és mts., 2004
GB112131	<i>ΔhupSL, ΔhoxH, ΔHynSL Er^r Gm^r Sm^r</i>	Rákhely és mts., 2004
M539	a <i>hypF</i> gén mutáltatva <i>T. roseopersicina</i> BBS-ben Km ^r	Fodor és mtsai., 2001
pTHOE5M	pTHOE5M plazmid a <i>ΔhynSL, ΔhupSL, ΔhoxH</i> törzsben Er ^r Gm ^r Sm ^r Km ^r	Fodor Barna
GB2131pK18DSRS1S2	<i>GB2131+pK18DSRS1S2</i> (integrálódva) <i>ΔhupSL, ΔHynSL Er^r Gm^r Km^r</i>	Ez a munka
GB1121pK18DSRS1S2	<i>GB1121+pK18DSRS1S2</i> (integrálódva) <i>ΔhupSL, ΔHynSL Sm^r Gm^r Km^r</i>	Ez a munka

Felhasznált primerek

DSRS1	CTGCAGGAAGCCGACAAGAT
DSRS2	GTCGCGTGAAGGAGCTTATT
M13Foward	GTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCG
M13Rewerse	GCGGATAACAATTTTCACACAGGA

Felhasznált plazmidok:

Név	Jellemzők	Forrás
pK18mobSacB	ColE1, <i>sacB</i> , K ^r szűk gazdasepcifitású integrálódó vektor	Schafer és mtsai., 1994.
pK18DSRS1S2	pK18mobSacB + DsrS1-DsrS2 fragment SmaI helyre	Ez a munka.

Növesztési körülmények

E. coli növesztési körülmények:

Használt oldatok:

- **LB:** 1000 ml tápoldathoz 10 g tripton, 5 g élesztő kivonat, 10 g NaCl
- Lemez: LB + 1,5% agar
- **SOB+Mg²⁺:** 1000 ml tápoldathoz 20 g tripton, 5 g élesztő kivonat, 0.5 g NaCl, 10 ml 10 M-os MgSO₄

Növesztés 37 °C -on 16 órán keresztül.

Alkalmazott antibiotikum koncentrációk: ampicilin 100 mg/ml, kanamicin 25 mg/ml.

T. roseopersicina növesztési körülmények:

A *Thiocapsa roseopersicina* törzseket illetve a leoltásokhoz szükséges startereket 25-28 °C-on, folyamatos megvilágítás mellett, teletöltött csiszolt dugós üvegekben, Pfennig-féle tápoldatban növesztettem 5 napig. (Pfennig és mts., 1992)

Használt oldatok:

- **Pfennig-féle tápoldat (PC):** 1 literre: 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 ampicilin 100 mg/ml, kanamicin 25 mg/ml. Gentamicin 5 mg/ml Streptomycin 25 mg/ml (Pfennig és mts., 1992)
- **Mikroelem oldat:** 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, 1000 ml vízben (Pfennig és mts., 1992)

Kémiai kompetens sejt készítése

A NOVA BLUE illetve S17-1 lambda-pir sejteket 60 ml SOB-ban OD₆₀₀=0,4-ig növesztettem 22 °C-on, ezt követően 10 percre jégre raktam, majd 2500 g-n, 4 °C-on 10 percig centrifugáltam. Az összegyűlt sejteket jégen tartva 16 ml TB (Pipes 10 nM, MnCl₂ 55 mM, CaCl 15 mM, KCl 250 mM pH 6,7) pufferben felfuszpendáltam, és újra 2500 g-n, 4 °C-on 10 percig centrifugáltam. A sejteket 4 ml TB pufferben felfuszpendáltam, 300 µl DMSO-t adtam hozzá és 10 percig jégen inkubáltam. Ezután 100 µl-enként, előre lehűtött mikrocentrifuga csövekbe szétosztva, folyékony nitrogénben fagyasztottam, majd -80 °C-on tároltam őket (Inoue és mtsai., 1990).

DNS manipulációs technikák

Genomi DNS izolálás *T. roseopersiciná*-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 *E. coli*-ból

Plazmid izoláláshoz antibiotikumot tartalmazó LB tápoldatba oltottam le egy kiválasztott telepet majd egész éjszakán át 37°C-on rázatva növesztettem. Alacsony kópiaszámú plazmid tisztításához 100 ml-be oltottam le, és a QIAGEN „Plasmid Midi Kit”-et (kat. szám: 12145) használtam. A gyártó utasításai szerint jártam el.

Agaróz gélelektroforézis

Az analitikai és preparatív célokból végzett gélelektroforézisekhez 1,0%-os, 0.5 µg/ml EtBr-ot tartalmazó agaróz gélrt használtam. A DNS-t 1xTAE (0,004 M Tris-acetát, 0,001 M EDTA) pufferben, 100 V feszültséggel futtattam 25 percig.

Fragment izolálás

Preparatív agaróz gélelektroforézist követően a kívánt DNS fragmentet steril penge segítségével kivágtam és 1.5 ml-es mikrocentrifuga csőbe raktam. A DNS izolálását a gélből a Fermentas DNS extrakciós kitjével (Fermentas, Kat. szám: KO513) végeztem el. 200 µl térfogatú géldarabhoz háromszoros mennyiségű NaI oldatot adtam és az agaróz oldódásáig 55°C-on rázattam. Szilikaport adtam az oldathoz és 5 percig 55 °C-on inkubáltam, gyakran kevertetve. 2 perces centrifugálás (13000 rpm) után a mátrixot átmostam 500 µl mosó pufferrel, majd 1 percig centrifugáltam 13000 rpm-en. A mosást még kétszer megismételtem, majd az utolsó centrifugálás után a szilikagélt levegőn szárítottam 2 percig. Ezután a szilikaporra 10 µl desztillált vizet raktam és 55 °C-on inkubáltam 5 percig, gyakran keverve, majd centrifugáltam 2 percig 13500 rpm-en. A felülúszót másik centrifugacsőbe vittem át. Az elúciós folyamatot még egyszer megismételtem, a felülúszókat egyesítettem.

PCR reakció

Eppendorf 5415R típusú készülékben végeztem a reakciókat. Az alábbi koncentrációjú reagensekből a végtérfogat 1/10 részét adtam a reakcióhoz: primerek (10pmol/µl), 2mM-os dNTP, 10 x DNS polimeráz puffer valamint 1 unit Pfu (Thermo Scientific) DNS polimerázt adtam az elegyhez. Templát DNS-ként 1000* hígított plazmid vagy genomi DNS-t vagy kolónia PCR esetében 2 µl sejtszuszpenziót (1 kolóniát 100µl vízben szuszpendáltam 10 percig 95 °C-on főztem) használtam. 20 µl végtérfogatban dolgoztam. Egy tipikus programciklus: 1 perc 95 °C, 1 perc 60 °C, 1 perc 72 °C. A denaturációs, hibridizációs, elongációs lépéseket 30X ismételtem, majd a záróciklus: 5 perc 72 °C volt. Ezt a programot használtam mind az inszert előállítására, mind a kolóniák ellenőrzésére. Abban az esetben, amikor a klónok ellenőrzését végeztem DyNAzyme (Thermo Scientific) enzimet használtam.

Restrikciós emésztés

A restrikciós emésztéseket Fermentas „fast digest” enzimekkel végeztem az enzimek saját gyári 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 (FastAP)

Az izolált lineáris vektorokat a Fermentas gyártmányú FastAP alkalikus foszfatázzal kezeltem a gyártó útmutatásai alapján. <http://www.thermoscientificbio.com>

Ligálás

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

Transzformálás

A betranszformálni kívánt DNS-t 100 µl jégen felolvasztott *E. coli* NOVABLUÉ kompetens sejtekhez adtam. 30 percig jégen tartottam majd 40 másodperces 42 °C-os hőshock után 900 µl SOB+Mg²⁺-ot adtam a sejtekhez. Ezután 1-1,5 órás 37 °C-on történő rázatás után, megfelelő antibiotikummal kiegészített lemezre szélesztettem a sejteket.

Konjugálás

A konjugációhoz a *T. roseopersicina* törzseket 28 °C-on és OD₆₅₀=1,8-ig, az *E. coli*-t 37 °C-on OD₆₀₀=0,6-ig, rezisztenciájuknak megfelelő antibiotikummal kiegészített tápoldaton növesztettem. A sejteket centrifuga segítségével gyűjtöttem össze, majd kétszer mostam 10 ml PC tápoldattal. A harmadik mosás alkalmával, a centrifugálást követően, egy kevés PC tápoldatban szuszpendáltam a sejteket. Az így kapott „sejtelegyet” konjugációs lemezre cseppentettem és beszárítottam (Pfennig és mts., 1992). Ezeket a lemezeket egy éjszakán át, fényen, levegőn, 28 °C-on inkubáltam.

Másnap hígítási sort készítettem a következő módon: a beszáradt sejteket átvittem 1 ml sóoldatba, felszuszpendáltam és ebből az oldatból háromlépcsős 10x-es hígítási sort készítettem sóoldat segítségével. Ebből a sejtszuszpenzióból 100-100 µl-t szélesztettem ki antibiotikum tartalmú szelektív lemezekre. Az így kapott lemezeket anaerob dobozokba (Oxoid, melyet Oxoid anaerogen AN0025A katalógusszámú anaerobizálóval mentesítettem az oxigéntől), helyeztem és folyamatos megvilágítás mellett 14 napig, 28 °C-on növesztettem.

Mérési módszerek

***In vivo* hidrogén termelés mérése**

A baktérium törzseket módosított Pfennig-féle tápoldatba oltottam le, hypovial üvegekbe, ezután nitrogén gázzal anaerobizáltam a lezárt üvegeket. Elemi kénen történő növesztés esetén 100 ml 0,25 g/l NaHCO₃-ot és 5 µM NiCl₂-ot tartalmazó, tioszulfát mentes Pfennig-féle tápoldatot használtam. Tioszulfáton történő növesztés esetén 60 ml 5 µM NiCl₂ tartalmú Pfennig-féle tápoldatba oltottam. A hidrogén termelés meghatározásához Hamilton fecskendővel 500 µl-t fecskendeztem gázkromatográfba (Agilent 6890 gázkromatográf, Molekular sieve 5Å (30m*0,53mm*530µm) kolonna, argon vivógáz, 16,9 ml/perc áramlási sebesség, 60 °C kolonna tér hőmérséklet, 160 °C detektor hőmérséklet, TCD detektor) a minták légteréből (http://www.restek.com/chromatogram/view/GC_PC00170/1333-74-).

***In vivo* kénhidrogén termelés és szén-dioxid mérése**

Az *in vivo* hidrogéntermelés fejezetben leírt növesztési körülményeket alkalmaztam. Hamilton mikrofecskendővel 100 µl-t fecskendeztem gázkromatográfba (Shimadzu GC-2010 típusú gázkromatográf, Split 0,5:1. 76,4 ml/perc áramlási sebesség, nitrogén vivógáz, PLOT-Q kolonna (30 m X 0,35 mm X 0,4 µm), hővezetőképességi (TCD) detektor, 150°C detektorhőmérséklet) a minták légteréből. A kénhidrogén meghatározása esetén 120 °C volt a kolonna tér hőmérséklete, a szén-dioxid meghatározása esetén 90 °C (<http://www.chem.agilent.com/en-US/products-services/Columns-Sample-Preparation/GC-GC-MS-Columns/Capillary/HP-PLOT-Q/Pages/default.aspx>).

Tioszulfát, szulfit mennyiség meghatározása

A tioszulfát és szulfit meghatározását folyadékkromatográffal végeztem. 1 ml mintát vettem a kultúrákból, majd 13000 rpm, 10 perc centrifugálás után HPLC küvettába pipettáztam a felülúszót. Az elválasztáshoz Transgenomic IC Sep AN1SC oszlopot használtam. Eluensként 1,7 mM NaHCO_3 -ot és 1,8 mM Na_2CO_3 -ot tartalmazó oldatot alkalmaztam 1 ml/perc áramlási sebességgel. Az oszlop termosztát hőmérséklete 30 °C fok volt. A detektálás a komponensek UV elnyelése alapján történt, dióda soros detektorral. A szulfit meghatározását 207 nm-en, a tioszulfát meghatározását 230 nm-en végeztem (Matsumoto és mts, 2001; McFeeters és mts, 2003)

Szulfát mennyiség meghatározása

A szulfát meghatározását folyadékkromatográffal végeztem. 1 ml mintát vettem a kultúrákból, majd 13000 rpm, 10 perc centrifugálás után HPLC küvettába 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 fok volt. A detektálás indirekt UV módban történt 263 nm-en (Rethmeier és mts, 1997).

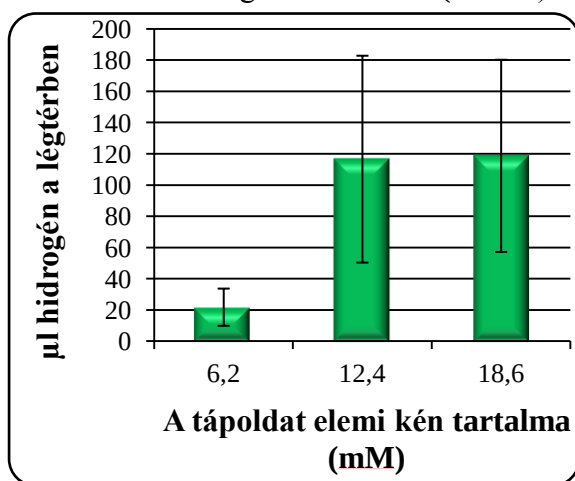
Eredmények és megvitatásuk

Tioszulfát hatása a *T. roseopersicina* hidrogenázainak hidrogén termelésére

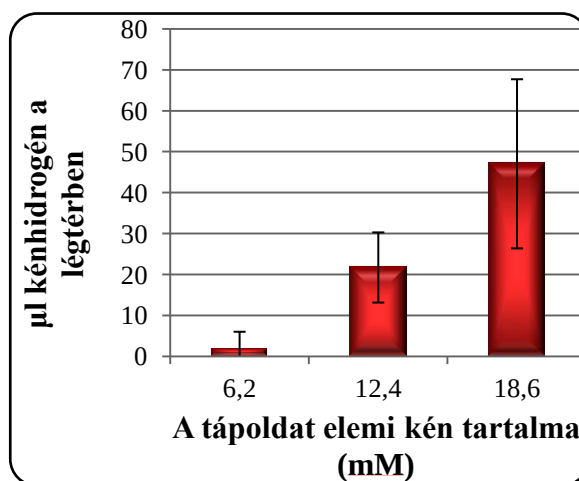
Korábban már kimutatták, hogy tioszulfáton, mint egyedüli elektronforrás, történő növesztés során mind a Hyn, mind a Hox1 hidrogenázok képesek hidrogéntermelésre (Rákhely és mts, 2007; Palágyi-Mészáros és mts, 2009). Ebből azonban nem következik egyértelműen, hogy a hidrogenázok hidrogén termelését a tioszulfát asszimilációból származó elektronok hajtánák meg, mivel ha tioszulfát van a rendszerben, akkor az elemi kén és szulfid oxidáció egyidejűleg végbemegy. Ezért elképzelhető, hogy a kapcsolódási pont az elemi kén vagy az ebből keletkező szulfid oxidációja. Ezért megvizsgáltam, hogy elemi kénen való növesztés esetén hogyan alakul a hidrogenázok hidrogén termelése.

Elemi kén hatása a Hyn hidrogenáz hidrogéntermelésre

A Hox1 hidrogenáz esetén már kimutatták korábban, hogy képes elemi kénen, mint egyedüli elektronforráson hidrogént termelni. (Rákhely és mts, 2007) Megvizsgáltam, hogy a pTHOE5M törzs, melyben mérési körülményeim között csak a rekombináns Hyn hidrogenáz aktív, képes-e az elemi ként egyedüli elektron forrásként felhasználni, és hidrogént termelni. Azt tapasztaltam, hogy a növekvő elemi kén koncentráció növelte a Hyn hidrogenáz hidrogén termelését (6. ábra). Továbbá azt tapasztaltam, hogy a nagyobb koncentrációban adott elemi kén hatására nem csak a hidrogéntermelés növekedett meg, hanem a kénhidrogén termelés is (7. ábra).

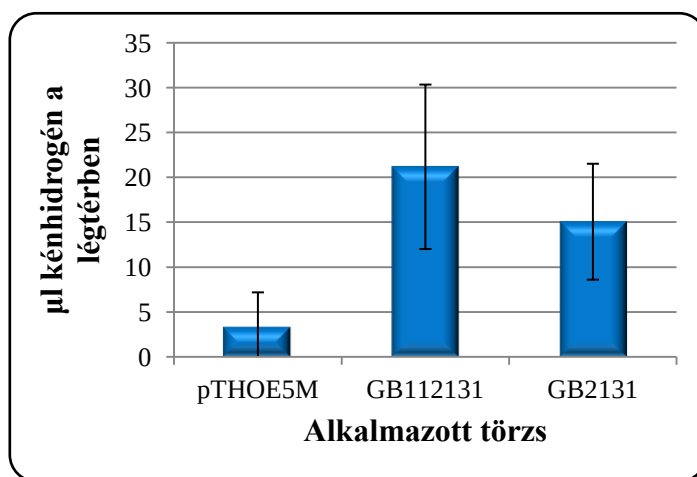


6. ábra A pTHOE5M törzs hidrogén termelése eltérő elemi kén koncentrációk esetén, a tápoldat kiindulási NaHCO_3 koncentrációja 0,25 g/l volt.



7. ábra A pTHOE5M törzs kénhidrogén képzése eltérő elemi kén koncentrációk esetén, a tápoldat kiindulási NaHCO_3 koncentrációja 0,25 g/l volt

Ugyanebben a kísérleti elrendezésben összehasonlítottam, hogy az aktív formában csak a vad típusú Hyn hidrogenázt tartalmazó GB2131, a rekombináns Hyn-t tartalmazó pTHOE5M törzseknek, és a mérési körülményeink között aktív hidrogenázt nem tartalmazó GB112131 törzseknek, hogyan alakul a kénhidrogén képzése. Azt tapasztaltam, hogy a pTHOE5M törzs esetében, mely több hidrogenáz enzimet tartalmaz, és hidrogént termel, kisebb a képződött kénhidrogén mennyisége (8. ábra). Eddigi eredményeim alapján kijelenthetjük, hogy a Hyn hidrogenáz hidrogén termelésében szerepe van az elemi kénnek, és a Hyn hidrogén termelése és modellorganizmusunk kénhidrogén képzése kompetitív folyamatok.



8. ábra Különböző törzsek kénhidrogén képzése 12,4 mM elemi kén és 0,25 g/l NaHCO₃ tartalmú tápoldatban.

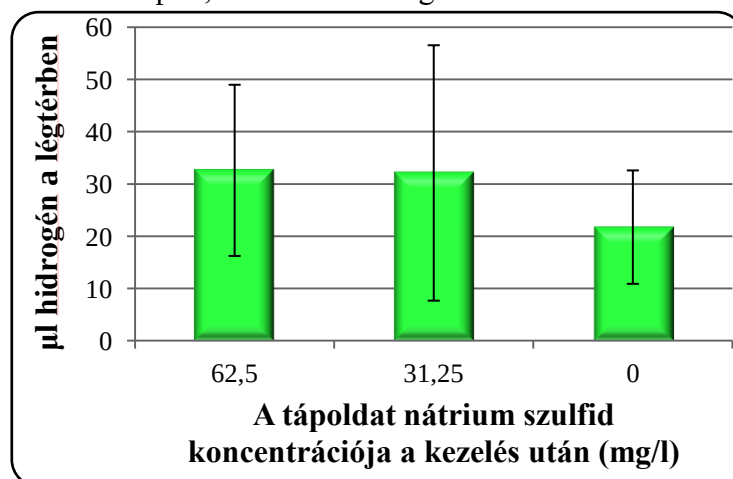
Elképzeltető, hogy nem a kénoxidáció, és az ebből származó elektronok, hanem a kénanyagcsere végső lépése, a szulfít szulfáttá alakítása, vagy a kénből származó kénhidrogén felhasználása szolgáltatja az elektronokat a Hyn és Hox1 hidrogenázok hidrogén termeléséhez. Ezen kérdésnek a megválaszolása a későbbi fejezetekben olvasható.

Kénvegyületek hatása a hidrogéntermelésre elemi kénen történő növesztés esetén

Szulfid hatása a Hyn hidrogenáz hidrogén termelésére

Az alapján hogy a Hyn hidrogenáz hidrogén termelése és a kénhidrogén képződés kompetitív folyamatok, továbbá, hogy a tápoldatban megnövelt elemi kén mennyiség nem csak a hidrogéntermelést, hanem a kénhidrogén képződést is növeli megvizsgáltam, hogy a tápoldatból a karbonát, mint szénforrás elfogyása után keletkező szulfidnak van-e

szerepe a Hyn hidrogenáz hidrogén termelésében. Megvizsgáltam a hozzáadott nátrium-szulfidnak a rekombináns Hyn-t tartalmazó pTHOE5M törzs hidrogén termelésére gyakorolt hatását elemi kén jelenlétében. Azt tapasztaltam, hogy a növesztés 4. napján a kezelt minták (nátrium-szulfid oldat hozzáadás) esetén nem látható szignifikáns eltérés a hidrogéntermelésben a 6. napon, az általunk vizsgált koncentráció tartományban (9. ábra).



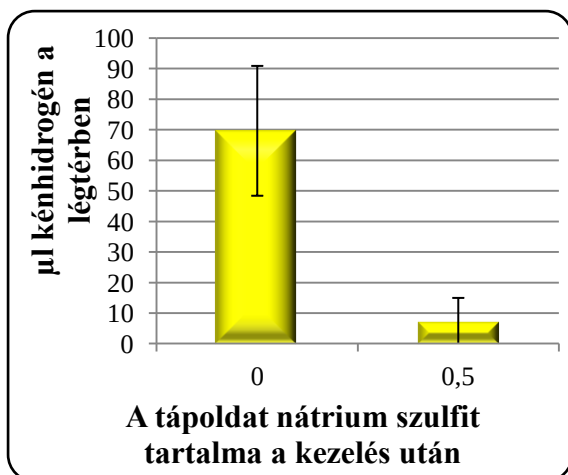
9. ábra Nátrium szulfid hatása elemi kén jelenlétében a pTHOE5M törzs hidrogén termelésére, 18,6 mM elemi ként és 0,25 g/l NaHCO₃ot tartalmazó tápoldatban. 0 mg/l esetén tiszta vizet adtunk a mintákhoz.

Ezen adatsoraink esetében rendkívül nagy szórást tapasztaltam, és minden esetben fennálló tendenciális különbség sem volt megfigyelhető, ezért nem tudom sem azt kijelenteni, hogy a szulfid asszimilációnak szerepe van a Hyn irányába történő hidrogéntermelésben, sem azt hogy nincs szerepe, ezért ezt a kérdést más kísérleti elrendezésben válaszoltam meg.

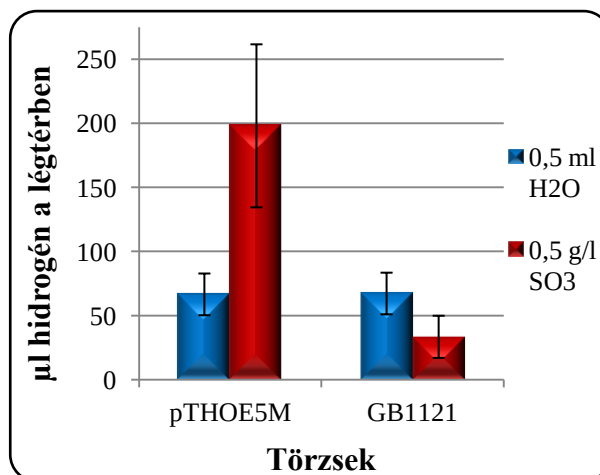
Szulfit hatása a Hyn és Hox1 hidrogenázok hidrogén termelésére

Vizsgáltam, hogy a szulfit milyen hatással van a Hyn hidrogenáz hidrogén termelésére elemi kén jelenlétében. A szulfitról ismert, hogy abiotikus reakcióban képes a szulfiddal tioszulfáttá reagálni. Ennek megfelelően azt tapasztaltam, hogy a nátrium szulfittal kezelt mintákban alacsonyabb volt a kénhidrogén mennyisége (10. ábra). Azt tapasztaltam továbbá, hogy a kezelés növelte a Hyn hidrogén termelését (pTHOE5M törzs) a 6. napra, (11. ábra). Mivel a szulfit elreagáltatta a szulfidot a rendszerből, de ennek ellenére növekedett a hidrogéntermelés, kijelenthetjük, hogy a szulfid nem szükséges a Hyn hidrogenáz hidrogén termeléséhez.

A szulfid mennyisége lecsökkent ugyan a kezelt mintákban, azonban tioszulfát keletkezett. Felmerül a lehetősége annak, hogy a tioszulfát szolgáltatta a megnövekedett hidrogéntermeléshez az elektronokat. Korábban azonban már bizonyították, hogy szulfít

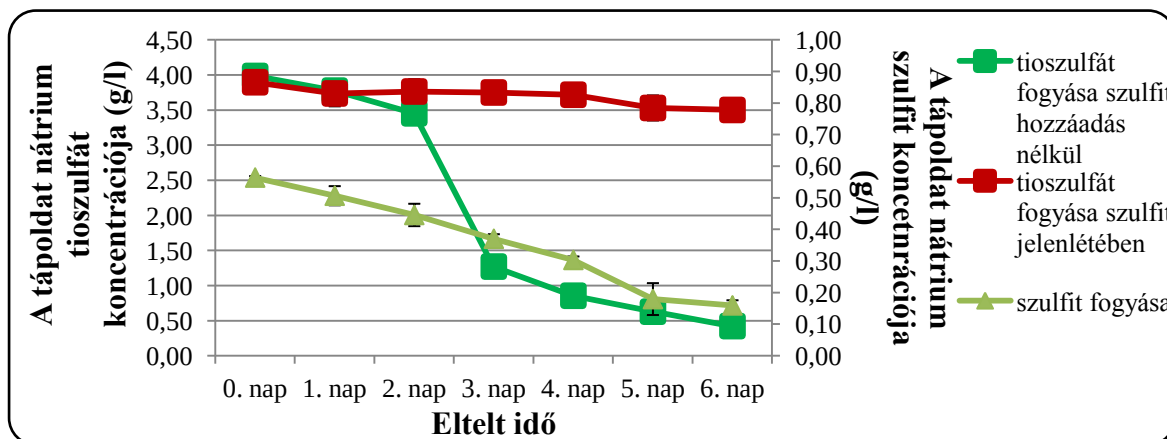


10. ábra A pTHOE5M törzs kénhidrogén képzésének változása nátrium szulfit hozzáadás után. A tápoldat kiindulási NaHCO_3 koncentrációja 0,25 g/l, az elemi kén koncentrációja 18,6 mM volt. (0 g/l esetén tiszta vizet adtunk hozzá)



11. ábra A pTHOE5M és GB1121 törzsek hidrogén termelésének változása nátrium szulfit hatására. A tápoldat kiindulási NaHCO_3 koncentrációja 0,25 g/l, az elemi kén koncentrációja 18,6 mM volt.

jelenlétében a tioszulfát asszimiláció kompetitíven gátolódik (Quentmeier és Friedrich, 2001). Ezt én is megerősítettem, amikor a *T. roseopersicina* kultúrák növesztését mind szulfítot, mind tioszulfátot tartalmazó tápoldatban végeztem, miközben a kénvegyületek mennyiségét követtem a tápoldatban (12. ábra). Ekkor a sejtek szulfít jelenlétében alig használták fel a tioszulfátot, és a szulfít fogyása volt domináns. Tehát *T. roseopersicina*-ban is fennáll a tioszulfát asszimiláció szulfít általi gátlása, így a megnövekedett hidrogéntermeléshez szükséges elektronok nem származhattak a tioszulfát asszimilációjából.



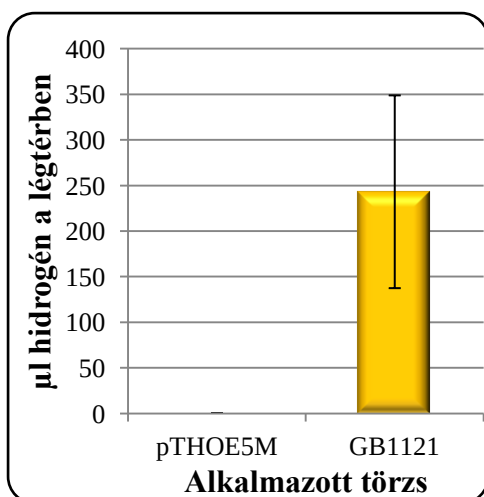
12. ábra A nátrium tioszulfát és nátrium szulfít koncentrációjának változása pTHOE5M törzs esetén. A tápoldat kiindulási NaHCO_3 koncentrációja 2 g/l volt.

Ugyanebben a kísérleti elrendezésben vizsgáltam a Hox1 hidrogenáz hidrogén termelését is. Itt a Hyn hidrogenázzal ellentétes eredményt kaptam, ugyanis a kezelés (nátrium szulfit oldat hozzáadása) csökkentette a Hox1 hidrogenáz (GB1121 törzs) hidrogén termelését (11. ábra). A két hidrogenáz eltérően reagált a szulfit hozzáadására elemi kénen történő növesztés esetén, ezért modellünk szerint, kapcsolatuk a kénanyagcserével eltér. Hogy ezt a kapcsolatot részletesebben jellemezzem, és tisztázzam azt a lehetőséget, hogy a szulfit szulfát átmenet során felszabaduló elektronok hogyan befolyásolják a hidrogéntermelést, megvizsgáltam, hogy a szulfit önmagában szolgáltat-e elektronokat a hidrogenázok hidrogén termeléséhez.

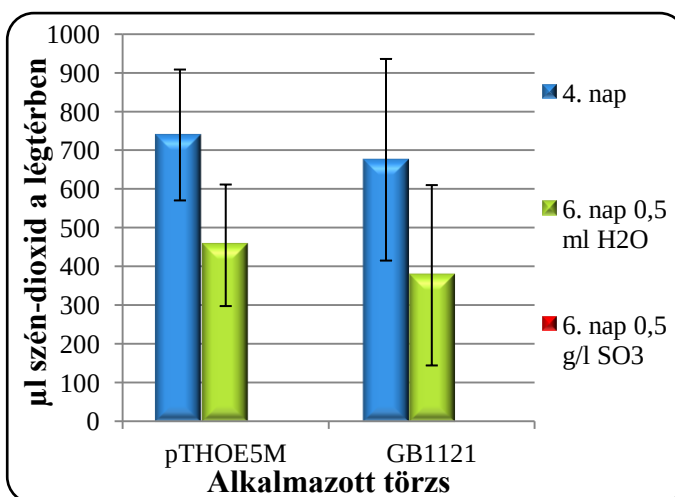
Szulfit, mint kizárólagos elektron donor hatása a Hyn és Hox1 hidrogenázok hidrogéntermelésre

A szulfiton, mint egyedüli elektronforráson nem sikerült az általam tesztelt körülmények között felnövesztetni a modellorganizmusunkat. Ugyanis a szulfit szulfát átmenet tioszulfát asszimilációhoz viszonyított alacsony kezdeti sebessége miatt nem biztosított elegendő elektront a sejtek megfelelő növekedéséhez. (12. ábra) Ezért a szulfitból történő hidrogén termelés vizsgálatára az eddigiektől eltérő növesztési körülményeket kellett alkalmaznom. Először 4 napig növesztettem, 2 g/l tioszulfát tartalmú PC tápoldatban a mérési körülményeink között aktív formában csak a Hox1 hidrogenázt tartalmazó GB1121, és a csak rekombináns Hyn-t tartalmazó pTHOE5M törzseket. Ekkor a negyedik napra a sejtek teljesen elhasználják a rendelkezésre álló tioszulfátot, azonban a tápoldatban még található karbonát, és nincs kénglobulus akkumuláció. A rendelkezésre álló karbonát mennyiségének relatív változását a légtérben megtalálható széndioxid mennyiségén keresztül követtem. A 4. napon történt kezelést (nátrium szulfit oldat hozzáadása) követően még 2 napig növesztettem a kultúrákat, és ezután mértem a hidrogéntermelésüket. A Hox1 és Hyn hidrogenázok esetén ellentétes eredményt kaptunk. Míg a Hox1 hidrogenáz képes volt hidrogént termelni, addig a Hyn hidrogenáz nem (13. ábra). A szén-dioxidot azonban mindkét törzs elhasználta szulfit jelenlétében, míg azok a minták, amikhez szulfitot nem adtam, nem használták el a karbonátot (14. ábra). Ebből megállapítottam, hogy a szulfit felhasználható a *T. roseopersicina* növesztésére, de csak abban az esetben, ha nem kizárólagos elektron donor. Továbbá a Hyn hidrogenáz nem képes a szulfit felhasználásából származó elektronokat hidrogéntermelésre fordítani, szemben a Hox1 enzimmel, ami igen (13. ábra).

Ezen adatokból, és abból, hogy elemi kénen történő növesztés esetén a Hyn hidrogenáz által volt hidrogéntermelés (6. ábra), arra következtethetünk, hogy a Hyn hidrogenáz és a kénanyagcsere közötti kapcsolatban a kénoxidációnak domináns szerepe van. Ezzel szemben a Hox1 hidrogenáz szulfitból is képes volt hidrogént termelni. Ez azt bizonyítja, hogy az ebből a lépésből származó elektronok is donorként szolgálhatnak a Hox1 hidrogenáz általi hidrogéntermeléshez. Viszont az, hogy az elemi kén mellé adott szulfit gátolta a hidrogéntermelést azt mutatja, hogy a kénoxidáció is fontos elektron donor a Hox1 számára (11. ábra). A Hox1-ről fent leírt megállapítások összhangban vannak Rákhely és mts, 2007, eredményeivel, mely szerint a Hox1 hidrogenáz a kénanyagcsere összes lépéséből kaphat elektronokat, viszont eredményeim tovább árnyalják a képet, miszerint a különböző szubsztrátok eltérő fontosságúak. Továbbá eredményeim rámutatnak arra az elsőként leírt fontos érdekességre, hogy a Hyn hidrogenáz csak elemi kén jelenlétében képes hidrogéntermelésre.



13. ábra A pTHOE5M és GB1121 törzsek hidrogén termelésének alakulása nátrium szulfit, mint kizárólagos elektron donor jelenlétében.

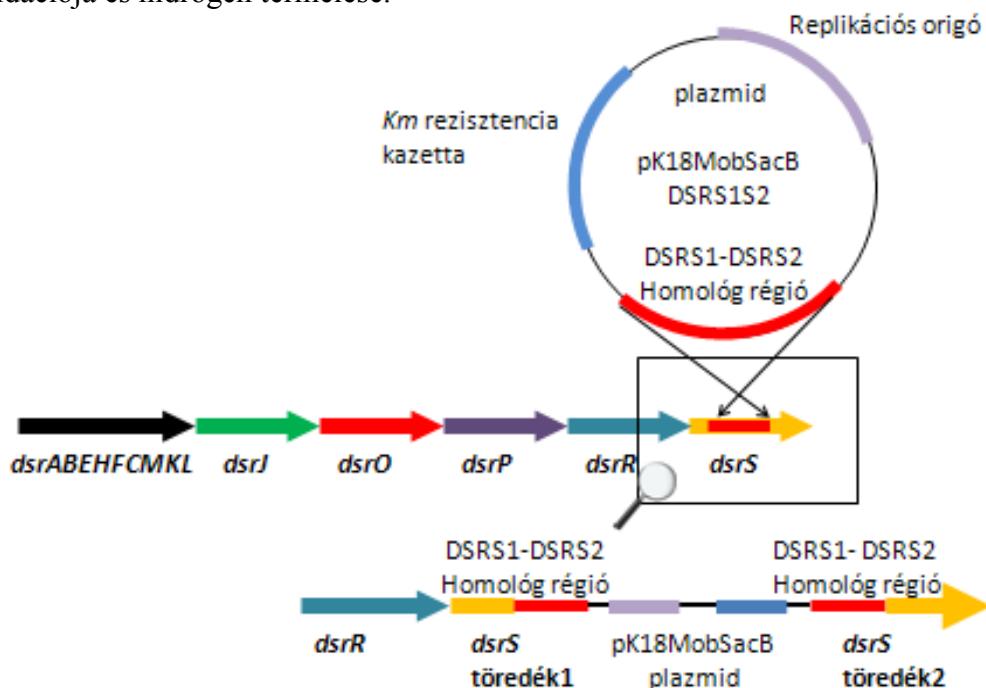


14. ábra A pTHOE5M és GB1121 törzsek NaHCO₃ asszimilációja nátrium szulfit, mint kizárólagos elektron donor jelenlétében.

A *dsrS* gén mutagenézise.

Annak bizonyítása, hogy a Hyn hidrogenáz a kénoxidációból kapja az elektronokat és a Hox1 hidrogenáz irányába történő elektron átadás is szerepe van a kénoxidáló Dsr rendszernek, nem *in frame* mutagenézisbe kezdtünk, hogy inaktíváljuk a Dsr enzimszisztéma S alegységét. Már munkatársaim megpróbálták *in frame* deléciós mutagenézissel kiütni a DsrK és DsrM alegységeket, hogy megvizsgáljuk hogyan alakul a hidrogén termelés a Dsr elektrontranszport alegységeinek hiányában, de az *in frame*

deléciós törzset nem sikerült elkészíteni, mert a K és M alegységek hiánya letálisnak bizonyult. További próbálkozások történtek arra, hogy tanszékünk dolgozói nem *in frame* elroncsolják a teljes *dsr* lókuszt GB1121 és GB2131 háttéren, bár ebben az esetben a törzset sikerült előállítani, azok növekedése, életképessége és karbonát asszimilációs képessége jelentősen elmaradt a vad típusétól, ezért hidrogéntermelési mérésekre használhatatlanok voltak. Azért a DsrS alegységnek a mutagenézisére esett a választás, mert *Allochromatium vinosumban* leírták, hogy a DsrS hiánya 50% ban csökkenti az elemi kén oxidációját. (Grimm és mts, 2011) Azért a leolvasási keret eltolásával járó megoldást választottuk, mert ez a *dsr* lokusz utolsó tagja, és ez a módszer 1 homológ rekombinációs lépést igényel, (15. ábra) ezért a mutáns törzs nagyobb valószínűséggel elkészíthető, az esetleges lassabb növekedése ellenére, mint a 2 homológ rekombinációs lépést igénylő *in frame* deléciós mutáns. Az elkészült törzsön pedig könnyen vizsgálható a kénoxidáció sebességének változása az esetleges növekedés gátlás és a hidrogéntermelésben beállt változás is. Ezekből az adatokból pedig megállapíthatjuk, hogy elkészíthető-e az *in frame* deléciós mutáns továbbá, ugyanúgy jellemezhető a DsrS fehérjét nem tartalmazó törzs kén oxidációja és hidrogén termelése.



15. ábra A *dsrS* gén nem *in frame* mutagenézisének vázlata

A konstrukció elkészítéséhez felszoroztam a DSRS1 és DSRS2 primerek közé eső genomi DNS szakaszt, majd a fragmentet kináz kezelése után, SmaI enzimmel emésztett defoszrorilált pK18MobSacB plazmidba ligáltam. Az elkészült konstrukciót *E. coli* XL1-Blue törzsbe transzformáltam, és PCR-el ellenőriztem a klónokat (DSRS1-

DSRS2). A klónokból folyadékkultúrában történő növesztés után plazmidot tisztítottam. A konstrukciót szekvenálással ellenőriztem, majd *E. coli* S17 törzsébe transzformáltam, ahonnan konjugálással *T. roseopersiciná*-ba juttattam. A kanamicint tartalmazó lemezen felnőtt kolóniákat PCR-el ellenőriztem (DSRS1 - M13Forward). Jelenleg a mutánsok - GB2131pK18DSRS1S2, GB1121pK18DSRS1S2 törzsek- jellemzése folyamatban van, de erről szóló eredményeket még nem tudok bemutatni.

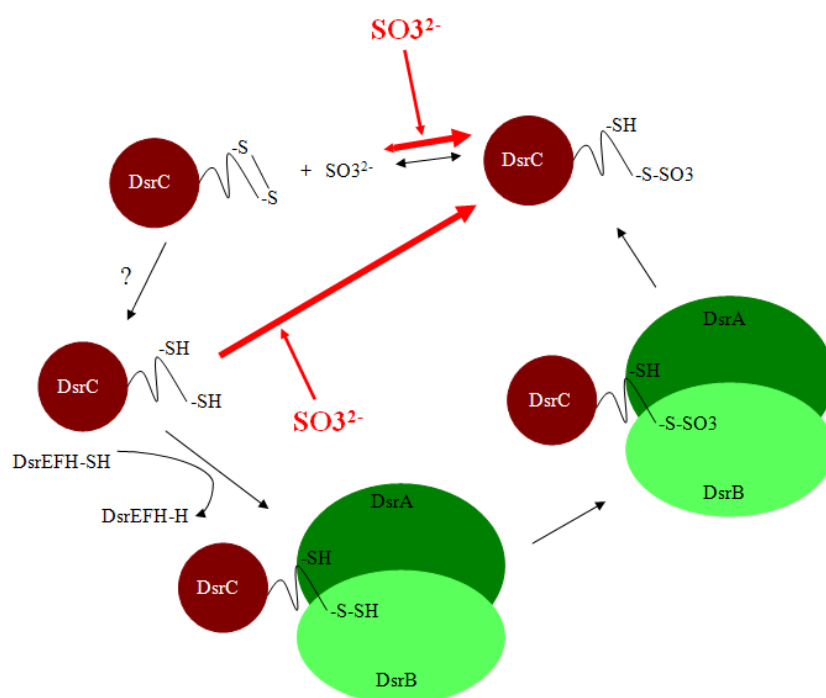
Összefoglalás

Összefoglalásul elmondhatom, hogy sikeresen összehasonlítottam a Hyn és Hox1 hidrogenázok fotobiohidrogén-termelését különböző kénvegyületek jelenlétében. Eredményeim alapján levontam azt a következtetést, hogy a Hyn hidrogenáz hidrogén termelésében a kénoxidációnak domináns szerepe van. Továbbá a Hyn hidrogenáz hidrogén termelésében nincs közvetlen szerepe sem a szulfidnak, és a szulfitnak is csak akkor, ha elemi kén van a rendszerben.

Ezzel szemben a Hox1 hidrogenáz számára a kén oxidációja és a szulfid asszimilációja is szolgáltat elektronokat, továbbá megállapítottam, hogy ezen lépések eltérő fontosságúak. Mivel a szulfid csak a Hox1, de nem a Hyn hidrogenáz elektron donora, és elemi kénen történő növesztés esetén eltérően reagáltak szulfid hozzáadására, ezért kijelenthetjük, hogy a két hidrogenáz kapcsolata a kénanyagcserével eltérő.

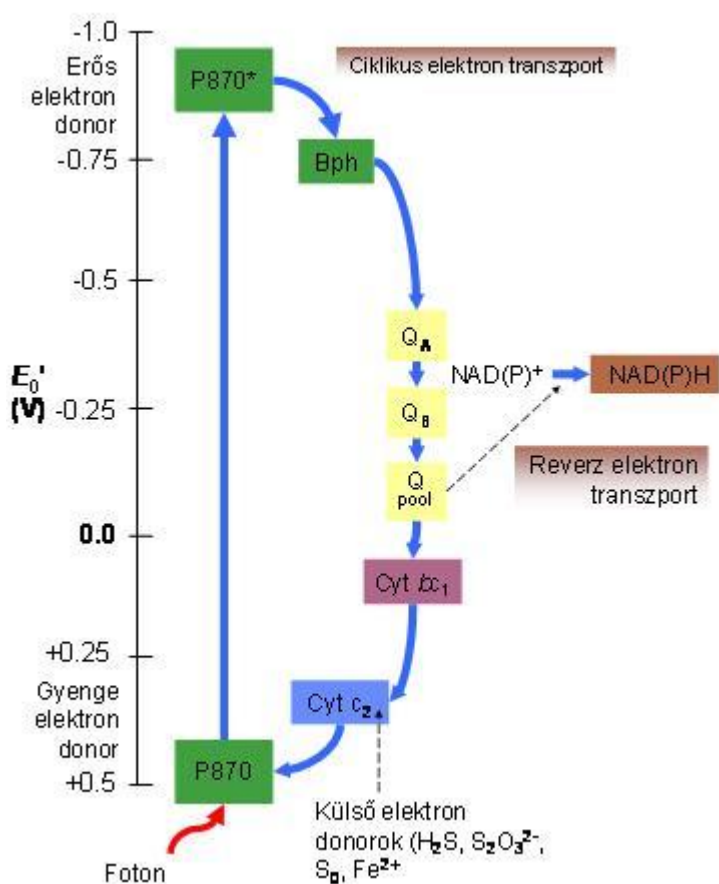
Jelenleg a szulfid hatásának pontos mechanizmusa nem ismert, azonban a méréseinkből és irodalmi adatokból felállítottunk egy modellt. A szulfid hatásának egyik mechanizmusa, hogy a szulfid, mint a kénoxidáció végterméke termékgátlást fejt ki a kénoxidáló Dsr enzimszisztémára. A Dsr rendszer legújabb modellje szerint a dsrAB enzim által katalizált reakció

során keletkezett szulfid a dsrC molekulán kötve található (Oliveira és mts, 2008), ahonnan egy reverzibilis reakció során diszulfid híd képződése közben hidrolizál (Stockdreher és mts, 2012). Feleslegben adott szulfid esetén nagyon valószínű, hogy a reakció egyensúlya eltolható abba az



13. ábra A szulfid hozzáadás lehetséges hatásmechanizmusa elemi kénen történő növesztés esetén.

irányba, amikor a dsrC szulfitot köt. Továbbá in vitro kísérletek során bizonyították, hogy a DsrC molekula redukált formája a külsőleg adott szulfitot képes megkötni. Ebben a formában azonban nem képes egy újabb perszulfid csoportot szállítani az oxidációhoz, így a kénoxidáció sebessége csökken (13. ábra). Ezen modell alapján a Hox1 csökkent hidrogén termelése a csökkent elektron felszabadulás miatt van, mivel a Hox1 hidrogenáz számára dominánsan csak a szulfitból származó 2 elektron állt ekkor rendelkezésre, míg szulfit hozzáadás nélkül az elemi kén oxidációjából származó 4 és a további szulfit oxidációból származó további 2 elektron is rendelkezésre állt. Így lehetséges, hogy a szulfit csökkentette a Hox1 hidrogén termelését elemi kén jelenlétében. Modellünk másik része szerint a két hidrogenáz kapcsolata a kénanyagcserével azért is eltér, mert a ciklikus elektron transzport más elemeitől/energiaszintjétől származnak az általuk hidrogéntermelésre fordított elektronok. Míg az elemi kén oxidációjából származó elektronok citokróm típusú molekulákon keresztül jutnak el a fotoszintetikus reakciócentrumba (alacsony energiaszintre), ahol megvilágítás esetén energiát nyernek, magasabb energiaszintre kerülnek, addig a szulfát/szulfit redox átmenet során keletkező



14. ábra A bíbor kénbaktériumok ciklikus elektron transzportjának vázlata (Madigan és Martinko, 2009).

elektronok magasabb energiaszinten lépnek be a ciklikus elektrontranszportba. Ezért képes a Hyn hidrogenáz termelni kizárólag akkor, ha elemi kén van a tápoldatban és erre csak megvilágítás mellett képes. Ezért van szükség fény által hajtott ciklikus elektrontranszportra, mert az tud elegendően alacsony redox potenciálú elektronokat szolgáltatni. Ennek fényében a Hyn hidrogenáz hidrogén termelése alacsonyabb redox potenciálú elektronokból valósul meg, mint a Hox1 hidrogén termelése. Azért növekszik meg

Hyn hidrogén termelése a szulfit hozzáadás hatására, mert a hirtelen a közegbe kerülő nagy mennyiségű szulfit oxidációjából származó elektron túltelíti a ciklikus elektron transzport lánc azon elemeit ahova a P870*-ról jövő nagy energiájú elektronok kerülnének, és ezen nagy energiájú / alacsony redoxpotenciálú elektronok egy részét vezeti el Hyn a hidrogén termelés irányába.

Ezen modell ugyan összhangban áll a fotoszintetikus elektrontranszport láncról és a kénoxidációról rendelkezésre álló ismereteinkkel, azonban a jövőben meg kell vizsgálnunk a Hyn és Hox1 hidrogenázok hidrogéntermelését molekuláris biológiai módszerekkel csökkentett kénoxidáció esetén. Továbbá vizsgálnunk kell, hogy a szulfit valóban csökkenti-e a kén oxidációját, és ténylegesen kevesebb elektron kerül-e a ciklikus elektron transzport láncba, ha szulfitot adunk elemi kén mellé.

Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni Dr. Rákhely Gábor tanszékvezetőnek és témavezetőmnek, hogy munkámat a SZTE TTIK Biotechnológiai Tanszékén lehetővé tette, valamint hogy munkámat figyelemmel kísérte és támogatta.

Köszönettel tartozom Tengölics Rolandnak a munkám során nyújtott folyamatos segítségéért, türelméért, valamint értékes elméleti és gyakorlati tanácsaiért.

Külön köszönettel tartozom Dr. Szőri-Dorogházi Emmának, aki a szakdolgozói munkám kezdetén nyújtott segítséget.

Ezúton szeretném megköszönni továbbá a Biotechnológiai Tanszék valamennyi dolgozójának az önzetlen segítségüket és támogatásukat.

Irodalomjegyzék

Andreas Schäfer, Andreas Tauch, Wolfgang Jäger, Jörn Kalinowski, Georg Thierbach, Alfred Pühler (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

Bogorov, L.V. (1974) The properties of *Thiocapsa roseopersicina*, strain BBS, isolated from an estuary of the White Sea. *Mikrobiologiya*. **43**:326-32,

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. *J.Mol.Biol.* **382** (3): 692-707.

Dahl C., Engels S., Pott-Sperling A. S., Schulte A., Sander J., Lubbe Y., Deuster O. és 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*. *J. Bacteriol.* **187** (4): 1392-1404.

Dahl C., Rakhely G., Pott-Sperling A. S. (1999) Genes involved in hydrogen and sulfur metabolism in phototrophic sulfur bacteria. *FEMS Microbiol.Lett.* **180** (2): 317-324

Dahl C., Schulte A., Stockdreher Y., Hong C., Grimm F., Sander J., Kim R., Kim S. H. és Shin D. H. (2008) Structural and Molecular Genetic Insight into a Widespread Sulfur Oxidation Pathway. *J.Mol.Biol.* **384** (5): 1287-1300.

Dementin S., Burlat B., De Lacey A. L., Pardo A., Adryanczyk-Perrier G., Guigliarelli B., Fernandez V. M. és 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.

Denkman K., Grein F., Zigann R., Siemen A., Bergmann J., van Helmont S., Nicolai A., Pereira I. A. C. és Dahl C. (2012) Thiosulfate dehydrogenase: a widespread unusual acidophilic c-type cytochrome. *Environ.Microbiol.* **14** (10): 2673-2688.

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.

Fodor B., Rákhely G., Kovács Á. T. és Kovács K. L. (2001) Transposon Mutagenesis in Purple Sulfur Photosynthetic Bacteria: Identification of hypF, Encoding a Protein Capable of Processing [NiFe] Hydrogenases in α , β , and γ Subdivisions of the Proteobacteria *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 2476-2483

Fontecilla-Camps J. C., Frey M., Garcin E., Hatchikian C., Montet Y., Piras C., Vernede X. és Volbeda A. (1997) Hydrogenase: a hydrogen-metabolizing enzyme. What do the crystal structures tell us about its mode of action. *Biochimie* **79** (11): 661-666.

Frigaard N. U. és Dahl C., Sulfur Metabolism in Phototrophic Sulfur Bacteria. *Advances in Microbial Physiology* **54** 103-200.

Gregersen L. H., Bryant D. A. és Frigaard N. U. (2011) Mechanisms and evolution of oxidative sulfur metabolism in green sulfur bacteria. *Front.Microbiol.* **2** 116.

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 *Allochromatium vinosum*. *J.Bacteriol.* **192 (6)**: 1652-1661.

Grimm F., Franz B. és Dahl C. (2011) Regulation of dissimilatory sulfur oxidation in the purple sulfur bacterium *Allochromatium vinosum*. *Front.Microbiol.* **2** 51. 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*. *Journal of Biological Chemistry* **280 (51)**: 42004-42015.

Hensen D., Sperling D., Truper H. G., Brune D. C. és Dahl C. (2006) Thiosulphate oxidation in the phototrophic sulphur bacterium *Allochromatium vinosum*. *Mol.Microbiol.* **62 (3)**: 794-810.

Inoue, H., H. Nojima and H. Okoyama (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**: 23-28

Kappler U. és Dahl C., (2001) Enzymology and molecular biology of prokaryotic sulfite oxidation1. *FEMS Microbiol.Lett.* **203 (1)**: 1-9.

Kovacs A. T., Rakhely G. és Kovacs K. L. (2003) Genes involved in the biosynthesis of photosynthetic pigments in the purple sulfur photosynthetic bacterium *Thiocapsa roseopersicina*. *Appl.Environ.Microbiol.* **69 (6)**: 3093-3102.

Kovacs K. L., Bagyinka C. és Tigyi G. (1988) Proteolytic Resistance and its Utilization in Purification of Hydrogenase from *Thiocapsa roseopersicina*. *Biochim.Biophys.Acta* **935 (2)**: 166-172.

Kovacs K. L., Kovacs A. T., Maroti G., Meszaros L. S., Balogh J., Latinovics D., Fulop A., David R., Doroghazi E. és Rakhely G. (2005) The hydrogenases of *Thiocapsa roseopersicina*. *Biochem.Soc.Trans.* **33 (Pt 1)**: 61-63.

Kovács K. L., Maróti G. és Rákhely G., (2006) A novel approach for biohydrogen production. *Int J Hydrogen Energy* **31 (11)**: 1460-1468.

Laska S., Lottspeich F. és Kletzin A. (2003) Membrane-bound hydrogenase and sulfur reductase of the hyperthermophilic and acidophilic archaeon *Acidianus ambivalens*. *Microbiology* **149 (Pt 9)**: 2357-2371.

- Lubbe 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 Microbiol.Lett.* **261 (2)**: 194-202.
- M Herrero, V de Lorenzo, and K N Timmis** (1990) Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **172**: 6557-6567
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J.** (2000) Brock Biology of microorganisms 10th Edition. Prentice Hall, New Jersey, pp. 608-611.
- Maróti G., Fodor B. D., Rákhely G., Kovács Á. T., Arvani S. és Kovács K. L.** (2003) Accessory proteins functioning selectively and pleiotropically in the biosynthesis of [NiFe] hydrogenases in *Thiocapsa roseopersicina*. *European Journal of Biochemistry* **270 (10)**: 2218-2227.
- Maróti G., Rákhely G., Maróti J., Dorogházi E., Klement E., Medzihradszky K. F. és Kovács K. L.** (2010) Specificity and selectivity of HypC chaperonins and endopeptidases in the molecular assembly machinery of [NiFe] hydrogenases of *Thiocapsa roseopersicina*. *Int J Hydrogen Energy* **35 (8)**: 3358-3370.
- Maróti J., Farkas A., Nagy I. K., Maróti G., Kondorosi É., Rákhely G. és Kovács K. L.** (August 1, 2010) A Second Soluble Hox-Type NiFe Enzyme Completes the Hydrogenase set in *Thiocapsa roseopersicina* BBS. *Applied and Environmental Microbiology* **76 (15)**: 5113-5123.
- Matsumoto H, Ogawa H, Suzuki K, Suzuki J, Saito K.** (2001) Determination of sulfite residues in foods by using the modified rankine apparatus and HPLC *Journal of the food hygienic society of Japan* **42 (5)**: 329-34.
- McFeeters R. F., Barish A. O.** (2003) Sulfite analysis of fruits and vegetables by high-performance liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet spectrophotometric detection. *J Agric Food Chem* **51 (6)**: 1513-1517
- Oliveira T. F., Vonnrhein C., Matias P. M., Venceslau S. S., Pereira I. A. és Archer M.** (2008) The crystal structure of *Desulfovibrio vulgaris* dissimilatory sulfite reductase bound to DsrC provides novel insights into the mechanism of sulfate respiration. *J.Biol.Chem.* **283 (49)**: 34141-34149.
- Palagyi-Meszaros L. S., Maroti J., Latinovics D., Balogh T., Klement E., Medzihradszky K. F., Rakhely G. és Kovacs K. L.** (2009) Electron-transfer subunits of the NiFe hydrogenases in *Thiocapsa roseopersicina* BBS. *FEBS J.* **276 (1)**: 164-174.
- Pfennig N. and H.G. Trüper** (1992). The Family Chromatiaceae The Prokaryotes vol.IV, 3200-3221.
- 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 (Pt 7)**: 1881-1894.

- Prange A., Engelhardt H., Truper H. G. és Dahl C.** (2004) The role of the sulfur globule proteins of *Allochrochromatium vinosum*: mutagenesis of the sulfur globule protein genes and expression studies by real-time RT-PCR. *Arch.Microbiol.* **182 (2-3)**: 165-174.
- Rakhely G., Colbeau A., Garin J., Vignais P. M. és Kovacs K. L.** (1998) Unusual organization of the genes coding for HydSL, the stable [NiFe] hydrogenase in the photosynthetic bacterium *Thiocapsa roseopersicina* BBS. *J.Bacteriol.* **180 (6)**: 1460-1465.
- Rákhely G., Kovács Á. T., Maróti G., Fodor B. D., Csanádi Gy., 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.
- Rakhely G., Laurinavichene T. V., Tsygankov A. A. és Kovacs K. L.** (2007) The role of Hox hydrogenase in the H₂ metabolism of *Thiocapsa roseopersicina*. *Biochim. Biophys. Acta* **1767 (6)**: 671-676.
- Rethmeier J., Rabenstein A., Langer M. és Fischer U.**, (1997) Detection of traces of oxidized and reduced sulfur compounds in small samples by combination of different high-performance liquid chromatography methods. *Journal of Chromatography* **760 (2)**: 295-302.
- Sánchez O., Ferrera I., Dahl C. és Mas J.**, (2001) In vivo role of adenosine-5'-phosphosulfate reductase in the purple sulfur bacterium *Allochrochromatium vinosum*. *Arch Microbiol* **176**: 301–305
- Sander J., Engels-Schwarzlose S. és Dahl C.** (2006) Importance of the DsrMKJOP complex for sulfur oxidation in *Allochrochromatium vinosum* and phylogenetic analysis of related complexes in other prokaryotes. *Arch.Microbiol.* **186 (5)**: 357-366.
- Sawers G.** (1999) The aerobic/anaerobic interface. *Curr.Opin.Microbiol.* **2 (2)**: 181-187.
- Stockdreher Y., Venceslau S. S., Josten M., Sahl H. G., Pereira I. A. és Dahl C.** (2012) Cytoplasmic sulfurtransferases in the purple sulfur bacterium *Allochrochromatium vinosum*: evidence for sulfur transfer from DsrEFH to DsrC. *PLoS One* **(7)**: e40785.
- Sun L., Åkermark B. és Ott S.**, (2005) Iron hydrogenase active site mimics in supramolecular systems aiming for light-driven hydrogen production. *Coord.Chem.Rev.* **249 (15–16)**: 1653-1663.
- Szóri-Dorogházi E., Maróti G., Szóri M., Nyilasi A., - Rákhely G. és Kovács K. L.** Analyses of the Large Subunit Histidine-Rich Motif Expose an Alternative Proton Transfer Pathway in [NiFe] Hydrogenases. *PLoS ONE* **7 (4)**: e34666
- Vignais P. M. és Billoud B.** (2007) Occurrence, classification, and biological function of hydrogenases: an overview. *Chem.Rev.* **107 (10)**: 4206-4272.
- 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 Lett.* **583 (8)**: 1281-1286.

Zander U., Faust A., Klink B. U., de Sanctis D., Panjikar S., Quentmeier A., Bardischewsky F., Friedrich C. G. és 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.

Zirngibl, C., Hedderich, R. and Thauer, R.K. (1990) N5, N10-Methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase from *Methanobacterium thermoautotrophicum* has hydrogenase activity. *FEBS Lett.* **261**, 112-116.

Nyilatkozat

Alulírott, Doffkay Zsolt II. éves biológus MSc szakos hallgató, kijelentem, hogy a TDK dolgozatban foglaltak saját munkám eredményei, és csak a hivatkozott forrásokat (szakirodalom, eszközök, stb.) használtam fel.

.....

Szeged, 2012. 11. 05.

Doffkay Zsolt