

# Fotobiohidrogén termelésében szerepet játszó enzimek bioszintézise és metabolikus kontextusa

Ph.D. értekezés

Nyilasi Andrea

Biológia Doktori Iskola

**Témavezetők:**

Dr. Rákhely Gábor

Prof. Kovács Kornél

Szegedi Tudományegyetem, Biotechnológiai Tanszék

Magyar Tudományos Akadémia, Szegedi Biológiai Kutatóközpont,

Biofizikai Intézet



Szeged

2014



---

# TARTALOMJEGYZÉK

---

<b>Tartalomjegyzék.....</b>	<b>2</b>
<b>1. Rövidítések jegyzéke .....</b>	<b>5</b>
<b>2. Bevezetés.....</b>	<b>7</b>
<b>3. Irodalmi áttekintés .....</b>	<b>8</b>
<b>3.1. Biológiai hidrogéntermelés .....</b>	<b>8</b>
3.1.1. Biofotólízis .....	8
3.1.2. Sötét fermentáció .....	9
3.1.3. Fotofermentáció.....	9
3.1.4. Kombinált sötét- és fotofermentáció .....	10
<b>3.2. A hidrogén-metabolizmus enzimeit .....</b>	<b>10</b>
3.2.1. Hidrogenázok.....	11
3.2.1.1. Hidrogenázok csoportosítása .....	11
3.2.1.2. [NiFe] Hidrogenázok bioszintézise .....	16
3.2.2. Nitrogenázok .....	18
3.2.2.1. A [MoFe] nitrogenáz.....	19
3.2.2.2. Az alternatív ([FeFe] és [VFe]) nitrogenázok.....	21
<b>3.3. <i>Thiocapsa roseopersicina</i> .....</b>	<b>21</b>
3.3.1. A <i>T. roseopersicina</i> hidrogenázai .....	21
3.3.1.1. A membránkötött Hyn hidrogenáz.....	22
3.3.1.2. A membránkötött Hup hidrogenáz .....	23
3.3.1.3. A citoplazmatikus Hox1 hidrogenáz .....	23
3.3.1.4. A citoplazmatikus Hox2 hidrogenáz .....	24
3.3.2. A <i>T. roseopersicina</i> hidrogenázainak érése .....	24
3.3.2.1. A HupK kisegítő fehérje jellemzése .....	26
<b>4. Célkitűzések .....</b>	<b>28</b>
<b>5. Anyagok és módszerek .....</b>	<b>30</b>
<b>5.1 BAKTÉRIUMTÖRZSEK ÉS PLAZMIDOK .....</b>	<b>30</b>
5.1.1. <i>E. coli</i> , <i>T. roseopersicina</i> és <i>R. eutropha</i> törzsek megnevezése és leírása .....	30
5.1.2. Plazmidok megnevezése és leírása .....	31
<b>5.2. Baktériumok tenyésztése.....</b>	<b>31</b>
5.2.1. Az <i>E. coli</i> növesztési körülményei.....	31
5.2.2. A <i>T. roseopersicina</i> növesztési körülményei.....	31
5.2.3. A <i>R. eutropha</i> növesztési körülményei .....	32
<b>5.3 RNS-sel végzett munkák.....</b>	<b>33</b>
5.3.1. RNS izolálás .....	33
5.3.2. DNáz I kezelés.....	33
5.3.3. Reverz transzkripció .....	33
5.3.4. Kvantitatív real-time PCR .....	34

<b>5.4. DNS-manipulációs munkák.....</b>	<b>35</b>
5.4.1. Plazmid DNS tisztítása <i>E. coli</i> -ből .....	35
5.4.2. Agaróz gélelektroforézis .....	35
5.4.3. Fragment-izolálás .....	35
5.4.4. Emésztések restriktációs enzimekkel .....	36
5.4.5. Alkalikus foszfatáz kezelés .....	36
5.4.6. Polinukleotid kináz kezelés .....	36
5.4.7. Ligálás .....	36
5.4.8. Komplementáló konstrukciók készítése .....	36
5.4.8.1. pREV .....	36
5.4.8.2. pTRK .....	37
5.4.9. Kémiai kompetens sejt-készítés .....	37
5.4.10. Kémiai transzformálás .....	38
5.4.11. Konjugálás <i>T. roseopersicina</i> -ba .....	38
5.4.12. Konjugálás <i>R. eutropha</i> -ba .....	38
5.4.13. Polimeráz láncreakció .....	39
5.4.14. Nukleotidsorrend meghatározása .....	40
5.4.15. Helyspecifikus <i>hupK</i> deléciós mutáns készítése .....	40
5.4.16. Pontmutánsok készítése .....	40
<b>5.5. Membrán és szolubilis sejffrakciók izolálása .....</b>	<b>41</b>
5.5.1. Sejtek feltárása szonikálással .....	41
5.5.2. Membrán- és szolubilis frakció elválasztása ultracentrifugával .....	42
<b>5.6. Fehérjemunkák .....</b>	<b>42</b>
5.6.1. Denaturáló poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE) .....	42
5.6.2. Fehérje mennyiségi mérése Lowry módszerrel (Micro-Lowry módszer) .....	43
5.6.3. Western hibridizáció .....	43
<b>5.7. Analitikai módszerek .....</b>	<b>44</b>
5.7.1. <i>In vivo</i> hidrogéntermelés-mérés .....	44
5.7.2. <i>In vitro</i> hidrogénfelvevő aktivitásmérés .....	44
5.7.3. <i>In vitro</i> nitrogénáz aktivitásmérés .....	45
5.7.4. Tioszulfát tartalom meghatározása .....	45
5.7.5. Szervessav-tartalom meghatározás .....	45
<b>Eredmények és kiértékelésük .....</b>	<b>46</b>
<b>6.1. A HupK és a HoxV kisegítő fehérjék heterológ expressziója.....</b>	<b>46</b>
6.1.1. Heterológ komplementáció HupK fehérjével.....	46
6.1.2. Heterológ komplementáció HoxV fehérjével.....	47
<b>6.2. A HupK fehérjében lévő konzervált aminosavak azonosítása.....</b>	<b>50</b>
<b>6.3. A cisztein-mutáns HupK fehérjék hatása a Hup hidrogenáz aktivitására .....</b>	<b>51</b>
<b>6.4. Fotofermentatív hidrogéntermelés szerves szubsztrátokból.....</b>	<b>57</b>
6.4.1. Szerves savak hatása a Hox1 <i>in vivo</i> hidrogéntermelésére .....	58
6.4.2. Szerves savak hatása a nitrogénáz <i>in vivo</i> hidrogéntermelésére .....	59
6.4.3. Szerves savak hatása az M539 biomassza képzésére és tioszulfát felhasználására .....	61
6.4.4. A tejsav hatása a nitrogénáz <i>in vitro</i> aktivitására és expressziójára .....	63
<b>Összefoglalás .....</b>	<b>66</b>

<b>Summary.....</b>	<b>69</b>
<b>Hivatkozások jegyzéke .....</b>	<b>72</b>
<b>Köszönetnyilvánítás .....</b>	<b>82</b>
<b>Saját közlemények jegyzéke .....</b>	<b>83</b>

---

# 1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

---

<b>Ala:</b>	alanin
<b>Amp:</b>	ampicillin
<b>APS:</b>	ammónium-perszulfát
<b>ATP:</b>	adenozin-trifoszfát
<b>bp:</b>	bázispár
<b>cDNS:</b>	kiegészítő DNS
<b>CIAP:</b>	Borjú Vékonybél Alkalikus Foszfátáz
<b>Cys:</b>	cisztein
<b>DEPC:</b>	dietil-pirokarbonát
<b>DMSO:</b>	dimetil-szulfoxid
<b>DNS:</b>	dezoxiribonukleinsav
<b>dNTP:</b>	dezinukleozid-trifoszfát
<b>DTT:</b>	ditiotreitól
<b>EDTA:</b>	etilén-diamin-tetraecetsav
<b>Er:</b>	eritromicin
<b>FTIR:</b>	Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópia (Fourier Transform Infrared)
<b>g:</b>	nehézségi gyorsulás
<b>Gm:</b>	gentamicin
<b>HPLC:</b>	Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (High-Performance Liquid Chromatography)
<b>ICP-OES:</b>	Induktív csatolású plazma optikai emissziós spektroszkópia (Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry)
<b>kb:</b>	kilobázis
<b>kDa:</b>	kilodalton (atomi tömeg egység)
<b>Km:</b>	kanamicin
<b>LB:</b>	Luria-Bertani tápoldat

<b>MMLV:</b>	Moloney Murine Leukemia Virus - reverz transzkriptáza
<b>NAD:</b>	nikotinamid-adenin-dinukleotid
<b>NADP:</b>	nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
<b>NC:</b>	nitrogénfixáló körülmények
<b>OD:</b>	optikai denzitás
<b>PC:</b>	fotoautotróf körülmények
<b>RI:</b>	refraktív index
<b>rpm:</b>	percenkénti fordulatszám
<b>RT-PCR:</b>	valós idejű polimeráz láncreakció
<b>SDS:</b>	nátrium-dodecil-szulfát
<b>SDS-PAGE:</b>	denaturáló poliakrilamid gélelektroforézis
<b>Sm:</b>	sztreptomycin
<b>SOB:</b>	super optimal broth (tápanyagokban gazdag tápoldat)
<b>Tc:</b>	tetraciklin
<b>TEMED:</b>	N,N,N',N'-tetrametil-etilén-1,2-diamin
<b>TRIS:</b>	Trisz-(hidroximetil)-aminometán
<b>U:</b>	egység (unit)

---

## 2. BEVEZETÉS

---

Napjainkban az emberiség egyik legnagyobb problémája, hogy a fosszilis energiahordozók (szén, földgáz, kőolaj) keletkezése sokkal lassabb, mint felhasználásuk sebessége. A probléma egyáltalán nem új keletű, több mint 60 éve hangoztatják, hogy a szénalapú energiaforrásaink végesek és rendkívül környezetromboló hatásúak is. Ma már tényként kezelhetjük, hogy az antropogén hatások igenis felelősek a klímaváltozásért, ugyanis a fosszilis energiahordozók kitermelése és felhasználása során nagy mennyiségű üvegházhatást fokozó gáz (pl. szén-dioxid, nitrogén-oxidok, metán, klórozott szénhidrogének) kerül a légterbe (Pimentel 1991). Az igen sokrétű károkozásnak ma még beláthatatlan következményei lesznek, nincsenek módszerek, amelyekkel megjósolhatók, hogy meddig bírja még a bolygó ökoszisztémája az ilyen nagyfokú kizsákmányolást. Ha lehetőség van rá, minden tudományos eszközt meg kell ragadni, hogy minél előbb környezetkímélő megoldásokat találjunk.

A legegyszerűbb kémiai elem, a hidrogén ( $H_2$ ) lehet a jövő energiahordozója, mely hosszú távon képes fedezni az egyre növekvő energiaigényeket. Tulajdonságai sok szempontból kedvezőek: nem toxikus, nem korrozív, nem rákkeltő, nem radioaktív, nem üvegházhatású, a környezetbe való véletlenszerű kijutása során sem okoz semmilyen visszamaradó környezetszennyezést és megújuló forrásból származik. Egyszóval eleget tesz olyan alapvető követelményeknek, amelyek a fosszilis energiahordozók felváltásához szükségesek.

Molekuláris hidrogént elő lehet állítani különböző biológiai folyamatok segítségével, úgy mint a víz biofotolízise algákkal és cianobaktériumokkal, szerves vegyületek sötétfermentációja anaerob baktériumokkal, fotofermentáció fotoszintetikus baktériumokkal és végül olyan kétlépcsős rendszerrel is, amely a sötét- és fotofermentáció kombinációja. Élő sejtekben a hidrogenáz és a nitrogeáz enzimek katalizálják a protonok redukcióját. Annak érdekében, hogy környezetbarát és gazdaságos módon tudjunk minél nagyobb mennyiségű tiszta hidrogént előállítani, meg kell ismernünk ezeknek az enzimeknek az érését és metabolikus kapcsolatait.

---

## 3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

---

### 3.1. BIOLÓGIAI HIDROGÉNTERMELÉS

---

A biológiai hidrogéntermelő folyamatok, szemben a termo- és elektrokémiai hidrogén előállítási eljárásokkal, kevésbé energiaigényesek és sokkal inkább környezetbarátak. Továbbá új utat nyitnak a kimeríthetetlen, megújuló energiaforrások hasznosításában. A biológiai hidrogéntermelésben alkalmazott mikroorganizmusok legnagyobb része, melyek rendelkeznek a hidrogén-metabolizmus enzimeivel, az Eubaktériumok és az Archeabaktériumok doménjébe tartoznak. Ezekkel az élőlényekkel 4 féle módon lehet hidrogént termelni:

1. Víz biofotólízise algákkal és cianobaktériumokkal.
2. Szerves anyagok sötét fermentációja anaerob baktériumokkal.
3. Szerves vegyületek fotofermentációja fotoszintetizáló baktériumokkal.
4. Hibrid rendszerrel: a sötét és fotofermentáció kombinálásával.

A mikrobák két okból termelnek hidrogént. Az első és legfontosabb, hogy így megszabadulnak a felesleges redukáló erőtől, ezt a folyamatot katalizálják a hidrogenáz enzimek. A másik esetben a hidrogén melléktermékként keletkezik a nitrogenáz enzimszisztéma működése során, mely enzim elsődleges feladata a légkörben található molekuláris nitrogén megkötése és ammóniává való átalakítása (Kim 2011).

#### 3.1.1. BIOFOTOLÍZIS

---

Közvetlen biofotólízis során a zöldsalgák és a cianobaktériumok fotoszintézissel bontják a vizet molekuláris oxigénre, protonokra és elektronokra. A vízbontásból származó oxigéntermelésért a kettős fotokémiai rendszer a felelős. A felszabadult elektronok a fotoszintetikus elektrontranszport láncán keresztül az egyes fotokémiai rendszerhez kerülve redukálják a ferredoxint. A nitrogenáz vagy hidrogenáz működése során a redukált ferredoxin visszaoxidálódik és hidrogén keletkezik (Das 2008). Azt azonban meg kell jegyezni, hogy a közvetlen biofotólízis hidrogéntermelő hatékonyságát nagymértékben csökkenti az oxigén



jelenléte, ugyanis mind a hidrogenáz, mind a nitrogeáz oxigénre érzékeny enzimek (McKinlay, 2010).

A közvetett biofotólízis zöld algákban és cianobaktériumokban megkerüli ezt a problémát, mivel elkülöníti a hidrogéntermelést térben vagy időben az oxigéntermelő fotoszintézistől (Sasikala 1993, Sawers 1999). Nagyon sok formája létezik a közvetett biofotólízisnek, de a legelterjedtebb stratégia, hogy első lépésben a fototróf körülmények között felnövesztett zöldalga CO<sub>2</sub> fixálás közben nagy mennyiségű, szénhidrátban (keményítő, glikogén) gazdag, biomasszát képez. Majd a második lépésben ebből a szénhidráttraktárból felszabaduló energia hidrogénképzésre fordítódik (Oncel 2009).

Az időbeli elkülönítésen kívül a cianobaktériumok képesek térben is elválasztani az oxigénképződéssel járó CO<sub>2</sub> asszimilációt a hidrogéntermeléstől egy erre specializálódott sejttel, a heterocisztával (Tamagnini 2002, 2007). A heterociszta anaerob körülményeket biztosít a nitrogeáz hatékony működéséhez, miközben a vegetatív sejtek fotoszintetizálnak.

---

### 3.1.2. SÖTÉT FERMENTÁCIÓ

---

Fakultatív vagy obligált anaerob baktériumok (pl. *Enterobacter* sp., *Bacillus* sp., *Clostridium* sp.) is képesek hidrogént termelni szerves anyagok (szerves hulladékok) sötét fermentációjával. Az eljárás előnye, hogy mezőgazdasági szerves hulladékokat és szennyvizet is lehet fermentálni, ezáltal megoldást nyújt a hulladékkezelésre és a hidrogéntermelésre egyaránt (Kim 2011, Oh 2011). Ezek a fermentatív baktériumok a szerves anyagok igen széles körét képesek felhasználni egyedüli szén-, energia- és elektronforrásként, azonban nem képesek azokat maradéktalanul lebontani. A szigorúan anaerob *Clostridium acetobutylicum* a glükózt például acetonná, butanollá és etanollá redukálja (Jang 2013). A fakultatív anaerob *Escherichia coli* a glikolízise során keletkezett piroszőlősavat acetonná, etanollá és tejsavvá, a foszfoenolpiroszőlősavat pedig borostyánkőssavvá alakítja át (Wolfe 2005, Zhu 2004).

---

### 3.1.3. FOTOFERMENTÁCIÓ

---

A másik, napfény-függő hidrogéntermelő rendszer a fotofermentáció (Levin 2004), mely során a baktériumok szerves (acetát, butirát, tejsav, stb.) vagy szervesetlen (S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>, H<sub>2</sub>S, Fe<sup>2+</sup>, stb.)

anyagokból fedezik az elektronszükségeiket. Ide tartoznak a bíbor nem-kén baktériumok, a bíbor kén- és a zöld kénbaktériumok is (Rupprecht 2006). Közös jellemzőjük, hogy csak az I. fotokémiai rendszerrel rendelkeznek, tehát nem képződik oxigén, ami gátolná a hidrogén-anyagcsere enzimeinek működését.

A szubsztrát oxidációja során keletkező elektron, az elektrontranszport láncon keresztül a nitrogénázra vagy a hidrogénázra kerül, ami redukálja a  $H^+$ -t, hidrogén keletkezik és visszaáll a redox egyensúly a sejtben (Rupprecht 2006, Vignais 2006). A nitrogénáz aktivitáshoz szükséges ATP-t vagy az egyes fotokémiai rendszer által begyűjtött fényelnyelés, vagy az elektron transzport során kialakuló proton gradiens biztosítja. Meg kell azonban jegyezni, hogy a fototróf baktériumok olyan hidrogénázokkal is rendelkeznek, melyeknek elsődleges feladata a nitrogénáz által termelt hidrogén visszaoxidálása, az így keletkezett  $H^+$  és elektron a kinon raktárokon keresztül proton motoros erőt hoz létre, ami ATP szintézist eredményez. Tehát a fotofermentáció során keletkezett hidrogén nettó mennyisége a nitrogénáz által termelt hidrogén és a hidrogénáz által visszavett hidrogén mennyiségének különbsége.

---

#### 3.1.4. KOMBINÁLT SÖTÉT- ÉS FOTOFERMENTÁCIÓ

---

Önmagában a sötét fermentáció szubsztrát-átalakítása nem túl hatékony, hiszen kis molekulású szerves savak maradnak vissza fermentációs végtermékként. Ezek a szerves anyagok azonban tápanyagként szolgálhatnak fotoheterotróf baktériumok számára. Összekapcsolva e két rendszert, egy sokkal hatékonyabb kétlépcsős eljárással lehet a szerves hulladékokat hidrogénné átalakítani (Foglia 2010, Ljunggren 2010, Modarresi 2010).

---

### 3.2. A HIDROGÉN-METABOLIZMUS ENZIMEI

---

Az élet kémiai reakciók sorozatától függ, azonban ezek közül nagyon sok túl lassan megy végbe. Ezért a természet olyan katalizátorokat, enzimeket alkotott, melyek meggyorsítják ezen biokémiai reakciók sebességét. A protonok redukciójának és a hidrogén oxidációjának folyamatát katalizáló kulcsenzim a hidrogénáz. A reverzibilis reakció iránya a hidrogénázzal kölcsönható partner redoxpotenciáljától függ (Vignais 2004). A hidrogénázokon kívül a nitrogénáz is képes hidrogént képezni, bár ennek az enzimnek a feladata elsősorban a légköri nitrogén ammóniává

való redukciója, és ebben a folyamatban jelenik meg a hidrogén, mint melléktermék (McKinlay 2010, Ghirardi 2007). Az energiaveszteség csökkentése érdekében a nitrogénázok mellett hidrogén felvételre képes (hydrogen uptake) hidrogenázok is működnek, melyek elsődleges feladata, hogy újrahasznosítsa a nitrogénáz által termelt hidrogént.

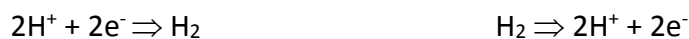
---

### 3.2.1. HIDROGENÁZOK

---

Az első hidrogenázokat a Bacteria és az Archea doménbe tartozó prokariótákból izolálták (Adams 1980, Graf 1981). Későbbi kutatások kiderítették, hogy alacsonyabb rendű egysejtű eukariótákban is megtalálható a hidrogenáz, például a protozoák hidrogenozómájában (Benchimol 2009, Page-Sharp 1996) vagy az egysejtű zöldalgák, mint pl. *Chlamydomonas reinhardtii* kloroplasztiszában (Bui 1996, Happe 2002).

A mai napig felfedezett hidrogenázok, egy csoport kivételével, közvetlenül vagy közvetetten, de részt vesznek vagy a hidrogén oxidációjának vagy a proton redukciójának katalizálásában, az alábbi egyenletek szerint (Vignais 2007):



Bizonyos hidrogenázok, mindkét folyamatot képesek katalizálni az aktuális fiziológiai redox állapottól függően: hidrogén és elektron akceptor jelenlétében hidrogén felvevő enzimként működik; alacsony redox potenciálú elektron donor jelenlétében a víz molekulából származó protont elektron akceptorként használva hidrogént termel. A hidrogenázok egy családja azonban hidrogénszenzorként működik és a hidrogenázok expressziójának szabályozásában van szerepe. Ilyen hidrogén szenzor enzimeket találunk például a *Bradyrhizobium japonicum*-ban (Black 1994), a *Rhodobacter capsulatus*-ban (Elsen 1996), a *Ralstonia eutropha*-ban (Lenz 1997), a *Rhodopseudomonas palustris*-ban (Rey 2006) és a *Thiocapsa roseopersicina*-ban (Kovács et al., 2005a).

---

#### 3.2.1.1. HIDROGENÁZOK CSOPORTOSÍTÁSA

---

Annak ellenére, hogy a hidrogenázok méretük, összetételük, sejten belüli elhelyezkedésük és elektron donoraik/akceptoraik tekintetében igen változatosak, három filogenetikailag különböző csoportba lehet őket osztani: a Ni és Fe atomot tartalmazó [NiFe], a

két Fe atomot tartalmazó [FeFe], illetve a speciális Fe tartalmú kofaktorról rendelkező Hmd vagy [Fe] hidrogenázok (Vignais 2001, Vignais 2007). Mindegyik csoportra jellemző, hogy rendelkezik egy, a csoporton belül konzervált alegységgel, mely az enzim működéséhez nélkülözhetetlen és tartalmazza az aktív centrumot. A csoportosítás alapja az aktív centrumukban lévő fém ionok.

### **Hmd vagy [Fe] hidrogenázok**

Számos metanogénben (pl. a *Methanothermobacter marburgensis*-ben (Zirngibl 1992) megtalálható ez a homodimer hidrogenáz, mely részt vesz a metanogenezisben, ahol az N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-metenil-tetrahidrometanopterin hidrogénnel való reverzibilis reakcióját katalizálja, miközben N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-metilén-tetrahidrometanopterin és H<sup>+</sup> keletkezik (Hartmann 1996). Szemben a hidrogenázok másik két csoportjával, a [Fe] hidrogenázok nem tartalmaznak [Fe-S] kockákat és aktív centrumukban egyetlen, nem redox aktív Fe atom helyezkedik el egy speciális piridon kofaktorhoz kötötten (Shima 2007).

### **[FeFe] hidrogenázok**

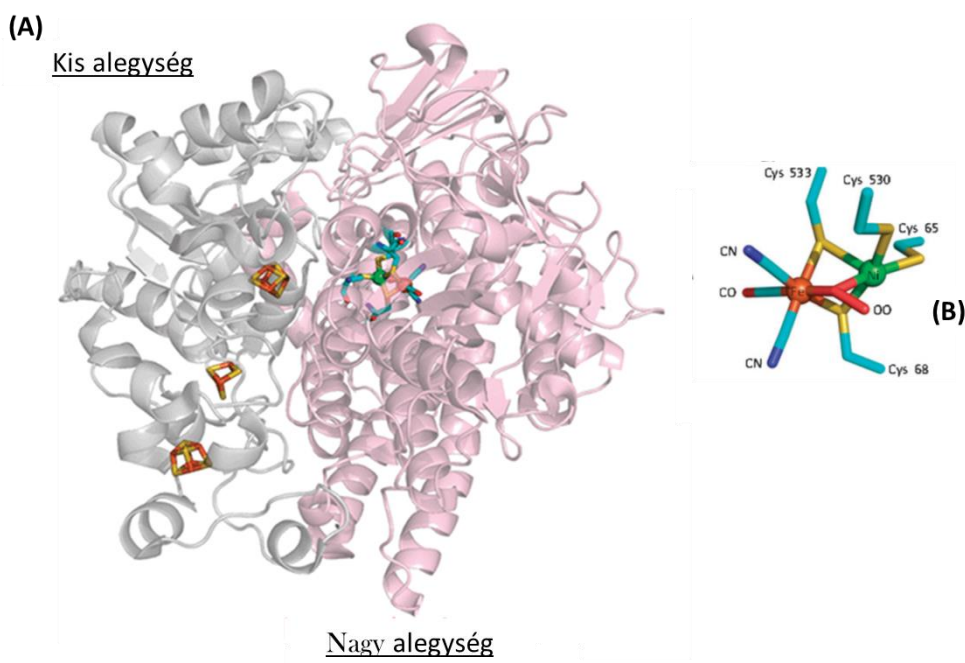
A hidrogenázoknak ez a csoportja anaerob, elsősorban hidrogéntermelő, fermentatív, vagy szulfátredukáló baktériumokban és a hidrogenázok közül egyedülként eukariótákban fordulnak elő (Vignais 2007). A [FeFe] hidrogenázok között találunk monomereket, homodimereket, de akár trimer vagy tetramer szerkezetűeket is (Vignais 2001). A csoport legtöbb tagjára jellemző, hogy oxigénre igen érzékeny, azonban vannak kivételek, mint például a *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough periplazmatikus enzime (Adams 1990).

Az összes [FeFe] hidrogenázban megtalálható négy konzervált cisztein, mely a [FeFe] hidrogenázokra jellemző H-klasztert rögzíti. Ez a konzervált domén tartalmazza az aktív centrumot, melyben két vasion és a hozzájuk kapcsolódó nem-fehérje természetű CN<sup>-</sup> és CO ligandok találhatóak (Peters 1998, Nicolet 1999, Peters 1999, Cammack 2001). Az aktív centrumhoz közvetlenül kapcsolódik egy [4Fe-4S] kocka is. Ez, valamint további három [4Fe-4S] egység játszik szerepet az elektronok szállításában a fehérje felszíni régiói felé.

### **[NiFe] hidrogenázok**

A [NiFe] hidrogenázok képezik a hidrogenázok legnépesebb és leginkább kutatott csoportját. Ezek az enzimek kevésbé érzékenyek az oxigénre, mint a [FeFe] hidrogenázok. Az

enzim katalitikusan fontos magja egy nagyobb és egy kisebb alegységből álló heterodimer (1. ábra). A kb. 60 kDa méretű nagy ( $\alpha$ ) alegységben található a nikkel és vas tartalmú aktív centrum, melyet négy, minden [NiFe] hidrogenázban megtalálható cisztein rögzít (Przybyla 1992, Volbeda 1995). Ezek az aminosavak az N- és a C-terminális közelében megtalálható, két, a [NiFe] hidrogenázokra általánosan jellemző CXXC motívumban helyezkednek el (Vignais 2007). A *Desulfovibrio gigas* periplazmatikus [NiFe] hidrogenázának szerkezeti elemzése során kiderült, hogy a 68-as és az 533-as pozícióban lévő ciszteinek mindkét fémionhoz kapcsolódnak, míg a Cys65 és a Cys530 kizárólag a nikkelhez kötődik (Volbeda 1995). A vashoz speciális ligandumok, egy CO- és két CN<sup>-</sup> csoport kapcsolódik (Volbeda 1996, Fontecilla-Camps 1997, Happe 1997, Pierik 1999, Volbeda 2002).



**1. ábra: A *Desulfovibrio gigas* [NiFe] hidrogenázának (A) és aktív centrumának (B) térszerkezete (Armstrong 2009).**

A kb. 30 kDa nagyságú kis ( $\beta$ ) alegységben két [4Fe-4S] és egy [3Fe-4S] kocka található, melyek az enzim aktív centruma és a megfelelő elektrondonor/akceptor közötti elektrontranszferért felelősek (1. ábra) (Vignais 2007). A hidrogenáz működéséhez az aktív centrumhoz legközelebbi (proximális) [4Fe4S] kocka jelenléte nélkülözhetetlen (Fontecilla-Camps 1997).

A nagy alegységek szekvenciáinak analízisekor két konzervált régiót lehet felfedezni annak a két pár ciszteinek a közelében, melyek az aktív centrum koordinálásában vesznek részt. Az aminosavsorrend összehasonlítása szolgál alapul a [NiFe] hidrogenázok további csoportosításához (Vignais 2007), mely jól korrelál az enzimek hidrogén-metabolizmusban betöltött szerepével és a sejten belüli elhelyezkedésével.

#### H<sub>2</sub>-felvevő [NiFe] hidrogenázok (1. csoport)

Ezekre az enzimekre jellemző, hogy kis alegységükön több jellegzetes régió figyelhető meg. Az egyik az N-terminálishoz közeli, TAT (twin-arginin translocation) transzport útvonalhoz tartozó szignálszekvencia, a másik a C-terminális közelében lévő, kb. 50 aminosav hosszúságú konzervált szakasz. Ez a hidrofób régió felelős a hidrogenáz rögzítéséért a membránban, valamint egy transzmembrán *b* típusú citokróm fehérje segítségével elektronokat juttat a légzési lánchoz kapcsolódó kinonraktárba. Mint azt a nevük is jelzik, ezek a hidrogenázok a hidrogént energiaforrásként használják fel, annak oxidációját összekapcsolják vagy anaerob elektronakceptorok (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, fumársav, CO<sub>2</sub>) vagy az O<sub>2</sub> redukciójával (aerob légzés). A folyamat során a sejtek az energiát transzmembrán elektrokémiai potenciál-különbséggé alakítják, majd ATP formájában tárolják (Vignais 2007).

Az 1. csoportba tartozó periplazmatikus *Desulfovibrio* hidrogenáz (Rossi 1993), valamint a *Thiocapsa roseopersicina* Hyn hidrogenáza (Rakhely 1998) képes kölcsönhatásba lépni az alacsony potenciálú *c* típusú citokrómokkal és egy *hmc* operon által kódolt transzmembrán redoxfehérje komplexszel is.

A nitrogénfixáló baktériumok (például *Rhizobium leguminosarum*, *Azotobacter sp.*) is rendelkeznek hidrogénfelvevő [NiFe] hidrogenázzal, mely révén képesek a nitrogénáz enzim által termelt molekuláris hidrogén visszavételére, aminek oxidálásával a sejt pótolni tudja a nitrogénfixálás során keletkező energiavesztést.

#### Citoplazmatikus H<sub>2</sub> szenzor és a cianobakteriális H<sub>2</sub> felvevő [NiFe] hidrogenázok (2. csoport)

A csoport tagjaira jellemző, hogy a kis alegységük N-terminálisáról hiányzik a TAT szignál szekvencia, mivel ezek az enzimek nem jutnak ki a membránba, hanem a citoplazmában maradnak.

H<sub>2</sub> szenzor [NiFe] hidrogenázokat, illetve génjeiket azonosították *B. japonicum*-ban (Black 1994), *R. eutropha*-ban (Lenz 2002), *T. roseopersicina*-ban (HupUV) (Kovács 2005) és *R. capsulatus*-ban (Rey 2006). Feladatuk a hidrogén jelenlétének érzékelése, és bizonyos hidrogénfelvevő hidrogenázok bioszintézisének szabályozása.

A cianobakteriális membránkötött [NiFe] hidrogenázok hasonló szerepet töltenek be, mint az 1. csoport tagjai, mégis közelebbi kapcsolatban állnak a H<sub>2</sub>-szenzor [NiFe] hidrogenázokkal. A hidrogén-metabolizmusban betöltött szerepük összefüggésben van a nitrogénáz enzimszisztéma működésével, nitrogénfixáló körülmények között aktiválódnak, de hozzájuk kapcsolódó citokrómokat még nem sikerült azonosítani (Happe 2000).

#### Kétirányú, heteromultimer, citoplazmatikus [NiFe] hidrogenázok (3. csoport)

Az ebbe a csoportba tartozó dimer hidrogenázok olyan alegységekkel asszociálódnak, melyek képesek szolubilis kofaktorokat (pl.: F<sub>420</sub>, NAD<sup>+</sup> vagy NADP<sup>+</sup>) megkötni. A kétirányú jelző a nevükben onnan ered, hogy reverzibilisen működnek, a kofaktorokat nemcsak redukálni, hanem a vízből származó protonokat elektronakceptoroként használva visszaoxidálni is képesek. Azonban hatékony működésükhöz alacsony hidrogén parciális nyomásra és nagy mennyiségű redukáló erőre, redukált kofaktorra van szükség.

A 3. csoport képviselői megtalálhatók a hipertermofil Archaeobaktériumok közé tartozó fajokban (*Pyrococcus furiosus* (Ma 2000), *Thermococcus litoralis* (Rákhely 1999)), de az Eubaktériumok, mint például *R. eutropha* (Schneider 1976), *T. roseopersicina* (Rákhely 2004, Maróti 2010), cianobaktériumok (például *Synechocystis* fajok (Appel 1996)) is rendelkeznek ilyen fehérjékkel.

#### Több alegységű, H<sub>2</sub>-termelő, energiakonzerváló, membránkötött hidrogenázok (4. csoport)

A hat vagy több alegységű álló enzimek a vízből származó protonokat redukálják, azért hogy megszabaduljanak a C1-es komponensek (pl.: CO, hangyasav) anaerob oxidációja során keletkezett felesleges redukáló ekvivalenstől (Böhm 1990, Sauter 1992, Fox 1996a, Fox 1996b). A 4. csoportba tartozó [NiFe] hidrogenázoknak tipikus képviselője az *E. coli* 3-as hidrogenáza, mely a formát-hidrogén liáz komplex részét képezi (Böhm 1990).

---

### 3.2.1.2. [NiFe] HIDROGENÁZOK BIOSZINTÉZISE

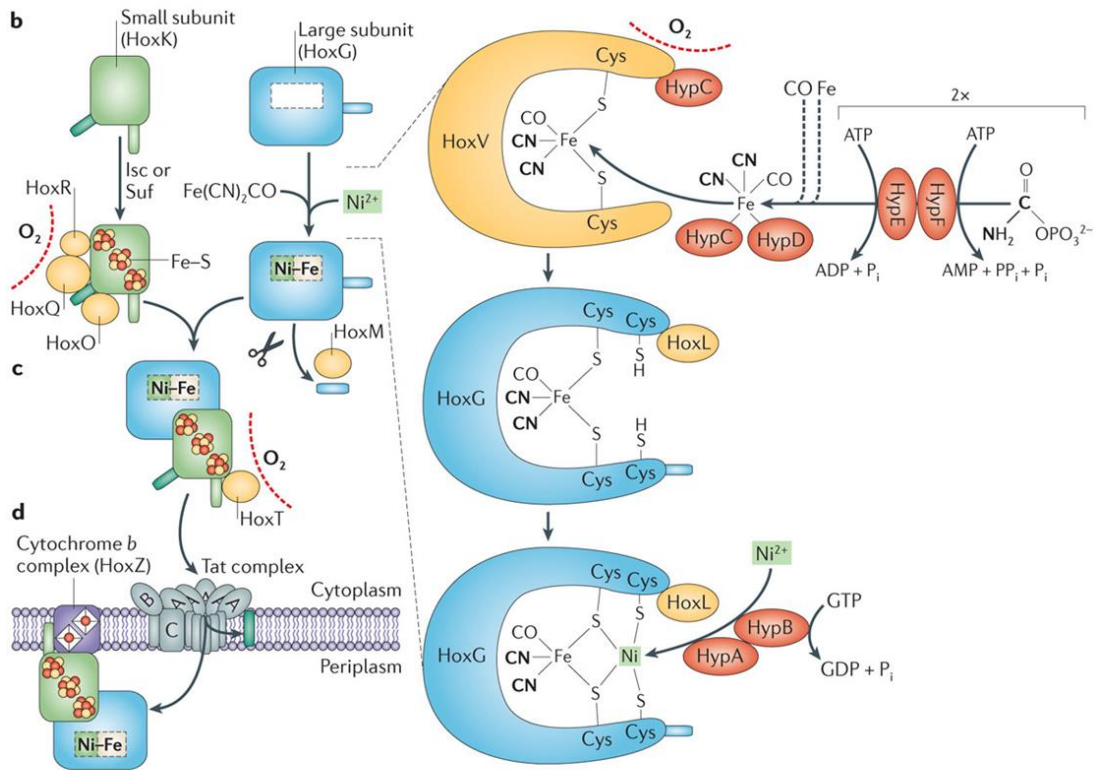
---

Ahhoz, hogy a [NiFe] hidrogenázok katalizálni tudják az egyik legegyszerűbb folyamatot ( $H_2 \leftrightarrow 2H^+ + 2e^-$ ), egy igen összetett szerkezetű enzimnek kell létrejönnie. Ahogy az előző fejezetben olvasható, amellett, hogy számos különböző metabolikus útvonallal állnak kapcsolatban, sejten belüli elhelyezkedésük és feladatuk is változatos. Bonyolult felépítésükből következik, hogy a hidrogenázok polipeptidláncának szintézise még nem eredményez aktív fehérjét. Az enzimek egy többlépcsős poszttranszlációs érési folyamaton mennek keresztül, mely során kialakul az érett hidrogenáz. A bioszintézishez számos ún. segédfehérje, vagy kisegítő fehérje összehangolt munkájára van szükség (Casalot 2001). Ezen fehérjék egy része hidrogenáz pleiotróp hatású (Hyp fehérjék), azaz a sejt összes hidrogenázának bioszintézisében részt vesz. Másik részük specifikusan csak egyféle [NiFe] hidrogenáz éréséért felelős, így ugyanannak a kisegítő fehérjének számos változata lehet egy sejtben (Maier 1996, Casalot 2001), amennyiben egynél több [NiFe] hidrogenázzal rendelkezik (pl.: a HybF a Hyd1 hidrogenázra, a HybG a Hyd2 hidrogenázra specifikus *E. coli*-ban) (Pierik 1999, Böck 2006, Forzi 2007, Leach 2007). Jelenlegi ismereteink alapján elmondható, hogy kb. 10-15 kisegítő fehérje szükséges egy aktív [NiFe] hidrogenáz összeszerelődéséhez (Cammack 2001).

Számos enzim esetén az érés során szerepet játszó összes segédfehérjét sikerült már beazonosítani, köszönhetően annak, hogy a kisegítő gének általában a struktúrgének közvetlen környezetében helyezkednek el. Ezek alapján kijelenthető, hogy legalább a HypA, HypB, HypC, HypD, HypE, HypF és egy specifikus endopeptidáz szükséges az érett nagyalegység kialakításához (2. ábra) (Soboh 2012, Bürstel 2012, Stripp 2013).

A [NiFe] hidrogenázok nagy alegységének érési modellje során (2. ábra) az első lépés, hogy a HypC-HypD fehérje komplex közvetlenül az éretlen nagy alegységhez szállítja a  $Fe(CN)_2CO$  kofaktort (Blokesch 2004, Watanabe 2007, Soboh 2013). Mivel a HypC egy chaperon fehérje, nyitott konformációban tartja az éretlen nagy alegységet az aktív centrum összeszerelődéséig (Magalon 2000, Blokesch 2002).





Nature Reviews | Microbiology

**2. ábra A membránkötött [NiFe] hidrogenáz érésének modellje, *R. eutropha* törzsben (Fritsch 2013)**

A *R. eutropha* membránkötött hidrogenázának (MBH) érése ennél a lépésnél eltér a modelltől, ugyanis egy HoxV kisegítő fehérje veszi át a HypC-HypD komplextől a  $\text{Fe}(\text{CN})_2\text{CO}$  csoportot és adja át az éretlen nagy alegységnek (Ludwig 2009). A CN<sup>-</sup> és CO- ligandumok a HypE-HypF komplex segítségével kerülnek a HypC-HypD komplex által kötött vashoz. A CN<sup>-</sup> ligandumok a karbamoil-foszfátról származnak, melyet a HypE-HypF komplex több, ATP-t igénylő lépésben alakít ki (Reissmann 2003, Petkun 2011, Blokesch 2004). A  $\text{Fe}(\text{CN})_2\text{CO}$  csoport beépülése után egy nikkeltető cink metalloenzim, a HypA beilleszti a nikkelt az aktív centrumba. Ehhez a lépéshez egy másik fehérje is szükséges, a GTPáz aktivitással rendelkező HypB. Erről a segédfehérjéről bizonyították, hogy *B. japonicum*-ban nemcsak a Ni beépítéséért, de a Ni raktározásáért is felelős (Fu 1995). A [NiFe] hidrogenáz nagy alegység érésének utolsó lépése a fehérje C-terminális rövid szakaszának levágása egy specifikus endopeptidáz segítségével (Theodoratou 2005). Ez csak és kizárólag abban az esetben történik meg, ha az aktív centrum

megfelelően szerelődött össze és a HypC fehérje levált a nagy alegységről (Magalon 2000). A [NiFe] hidrogenáz kis és nagy alegységének érése egymástól függetlenül zajlik, az enzim bioszintézisének utolsó lépése az alegységek összekapcsolódása.

### 3.2.2. NITROGENÁZOK

---

A nitrogénáz enzimeknek kulcsfontosságú szerepe van a nitrogén körforgásban, ugyanis a légkörben lévő nitrogén kémiaiilag semleges formában ( $N_2$ ) van jelen, a növények és az állatok ebben a formában nem tudják azt metabolizálni (Jia 2014). Azonban egyes mikroorganizmusok, nitrogénázai révén képesek a dinitrogént redukálni, ezáltal ammónia keletkezik (Burgess 1996, Howard 1996), ami viszont már hozzáférhető nitrogénforrást jelent a nitrogénázzal nem rendelkező élőlények számára is. Ezt a folyamatot nevezik nitrogénfixálásnak, mely során jelentős mennyiségű hidrogén keletkezik.

Az 1900-as évek környékén izolálták az első nitrogénfixáló baktériumot, és azóta már számos prokariótáról bebizonyították, hogy nitrogénázzal rendelkezik. Ez a tulajdonság azonban csak az Eu- és az Archeabaktériumokra jellemző, magasabb rendű élőlényekben ez az enzim nem fordul elő (Zehr 2003). Fél évszázaddal az első nitrogénfixáló baktérium felfedezése után, kidolgozásra kerültek olyan eljárások, melyek alkalmasak az aktív nitrogénáz izolálására. Ezek a módszerek hozzájárultak ahhoz, hogy az elkövetkező évtizedekben rohamléptekkel vizsgálhassák az enzim felépítését és működését.

A megszerzett ismeretek alapján a nitrogénázokat három típusba sorolhatjuk. A csoportosítás az egyedi fémtartalmú aktív centrumok szerint történik (Burgess 1996):

- molibdén tartalmú nitrogénáz ([MoFe] nitrogénáz),
- vas tartalmú nitrogénáz ([FeFe] nitrogénáz),
- vanádium tartalmú nitrogénáz ([VFe] nitrogénáz).

Mind a három nitrogénáz enzimkomplexre egyaránt jellemző, hogy miközben a nitrogént ammóniává alakítják át, jelentős mennyiségű hidrogént termel.

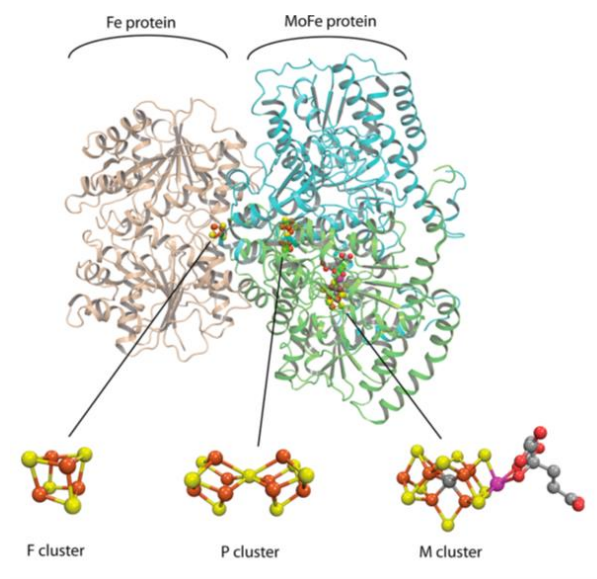
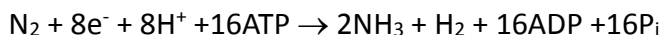
Az aktív centrumában molibdént és vasat tartalmazó [MoFe] nitrogénáz a legszélesebb körben előforduló és legrészletesebben tanulmányozott nitrogénáz. Az aktív centrumában csak vasat ([FeFe] nitrogénáz), illetve vasat és vanádiumot is ([VFe] nitrogénáz) tartalmazó

nitrogenázokat együttesen alternatív nitrogenázoknak nevezik (Newton 2000, Joeger 1988). Bár a három nitrogenáz szerkezetileg nagyon hasonló, mégis eltérő hatékonysággal, sztöchiometriával termelnek hidrogént. A nitrogén redukciót a leghatékonyabban a [MoFe] nitrogenáz katalizálja, ezt követi a [VFe] nitrogenáz, majd a [FeFe] nitrogenáz, mely a legkevésbé hatékony. A nitrogenázok elsődleges inhibitora/represszora az oxigén, mely irreverzibilisen inaktíválja az enzimet. A másik fontos inhibitor az ammóniumion, ami viszont reverzibilisen gátolja a nitrogenáz szintézisét és aktivitását (Jones 1979).

### 3.2.2.1. A [MoFe] NITROGENÁZ

Ez az elsődleges nitrogenáz az összes nitrogénfixálásra képes organizmusban előfordul (beleértve a *T. roseopersicina*-t is), kivéve néhány CO oxidáló baktériumot (Ribbe 1997). A [MoFe] nitrogenáz egy két alegységből álló komplex: elektrontranszfer [Fe] fehérje (dinitrogenáz reduktáz vagy II. komponens) és [MoFe] fehérje (dinitrogenáz vagy I. komponens)(3. ábra). Ez a két alegység egy katalitikus ciklus során asszociál és disszociál, mely folyamat együtt jár egy elektrontranszferrel és egy MgATP hidrolízissel.

A [MoFe] nitrogenázok által katalizált reakciót az alábbi egyenlettel lehet leírni:



3. ábra A [MoFe] nitrogenáz szerkezete (Hoffman 2014)

### 3.2.2.1.1. A [Fe] FEHÉRJE

---

A [Fe] fehérje homodimer ( $\gamma_2$ ) felépítésű. Megtalálható benne egy [4Fe-4S] kocka prosztetikus csoportként, ami hidat képezve kapcsolja össze a két alegységet (Georgiadis 1992), valamint ez köti a megfelelő elektrondonort, ami organizmustól függően lehet ferredoxin vagy flavodoxin. Továbbá mindkét alegység tartalmaz egy MgATP/MgADP kötő helyet.

### 3.2.2.1.2. A [MoFe] FEHÉRJE

---

Az  $\alpha_2\beta_2$  heterotetramer szerkezetű [MoFe] fehérje kétféle fém centrumot tartalmaz:  $\alpha\beta$  egységenként egy P-klasztert és egy [FeMo]-kofaktort. A P-klaszterben található egy [4Fe-4S] és egy [4Fe-3S] kocka (3. ábra). Elsődleges funkciója a [Fe] fehérjétől származó elektronok tárolása, majd továbbítása a [FeMo]-kofaktorhoz kapcsolódó szubsztrátra (Peters 1997). A [FeMo]-kofaktor az  $\alpha$  alegységek belsejében helyezkednek el, feladatuk a szubsztrát kötése és redukciója.

#### **Szubsztrát redukció**

MgATP és elektrondonor jelenlétében a [Fe] fehérje olyan konformáció-változáson megy keresztül, mely során a redoxpotenciálja kb. -200mV-ra csökken. Ezt követi a [MoFe] fehérje kapcsolódása, mely egyrészt tovább csökkenti a redoxpotenciált (kb. -600mV-ra), másrészt újabb konformáció-változást idéz elő a [Fe] fehérjén, ami lehetővé teszi egy elektron  $\gamma$ -alegységen keresztüli átjutását a [MoFe] fehérjére, ahol azok akkumulálódnak és megtörténik a szubsztrát redukciója (Newton 2000, Burgess 1996).

Ahhoz, hogy a [MoFe] nitrogénáz megfelelően elláthassa a feladatát, a [Fe] és a [MoFe] fehérjék redox ciklusának összehangolt működésére van szükség. A  $N_2$  redukció során a [FeMo] kofaktornak nyolc elektrorra van szüksége, miközben minden [Fe] fehérje megkötésekor csak egy elektron továbbítódik (Lowe 1984).

A  $N_2$  mellett a nitrogénáz számos kisméretű, hármas kötést tartalmazó vegyületet képes redukálni, pl. az acetilént ( $C_2H_2$ ) etilénné ( $C_2H_4$ ). Ez a leggyakrabban használt módszer a nitrogénáz aktivitás nyomonkövetésére, mivel az acetilén gáz könnyen elválasztható gázkromatográf segítségével a keletkező etilén gáztól (Burgess 1996).

---

### 3.2.2.2. AZ ALTERNATÍV ([FeFe] ÉS [VFe]) NITROGENÁZOK

---

Az alternatív nitrogénázokban a molibdént vanádium vagy vas helyettesíti. Előfordulásuk teljesen véletlenszerű (Newton 2000), a [MoFe] nitrogénáz mellett [VFe] nitrogénázt találtak már aerob baktériumokban (pl. *Azotobacter vinelandii*), fototróf baktériumokban (pl.: *Anabena variabilis*), illetve archebaktériumokban (pl.: *Methanosarcina barkeri*) is. [FeFe] nitrogénázt is azonosítottak *A. vinelandii*-ban (Chisnell 1988), de a fototróf *R. capsulatus* és a *Rhodospirillum rubrum* fajokban is.

---

## 3.3. THIOCAPSA ROSEOPERSICINA

---

A *T. roseopersicina* BBS egy, a *Chromatiaceae* családba tartozó anaerob fototróf, bíbor kénbaktérium (Bogorov 1974, Gogotov 1976, Pfennig 1983). Az 1-3 µm átmérőjű, nem mozgékony sejtek számára optimális növekedési hőmérséklet 24-28°C között van (Bogorov 1974). A vad típusú törzs, optimális növesztési körülmények között, folyadékkultúrában 5-6 nap alatt éri el a maximális sejtszámot, míg táptalajon két hét alatt alkot látható telepet.

Mivel anaerob fototróf baktériumok, nem képesek a víz bontására és nem termelnek oxigént, mint például a cianobaktériumok. Fotoszintézisük elektronigényét alternatív elektronforrásokból fedezik, például redukált kénvegyületeket (szulfid, tioszulfát, elemi kén stb.), esetleg egyszerű szerves szubsztrátokat (pl.: ecetsav) vagy akár molekuláris hidrogént is képesek hasznosítani a fotoszintetikus növekedés során. Habár alapvetően a *T. roseopersicina* egy anaerob, fototróf baktérium, aerob vagy mikroaerofil körülmények között sötétben kemolitoautotróf életmódot is tud folytatni (Kondratieva 1976). Abban az esetben, ha a tápoldat nem tartalmaz metabolizálható formában nitrogént, diazotróf életmódra vált át és a légköri nitrogént nitrogénáz enzimrendszere segítségével megköti (Bogorov 1974). A nitrogénfixáló folyamatot hidrogéntermelés kíséri. A *T. roseopersicina* hidrogén-metabolizmusának kulcsenzimeit a [NiFe] hidrogénázok és a [MoFe] nitrogénáz enzimrendszer.

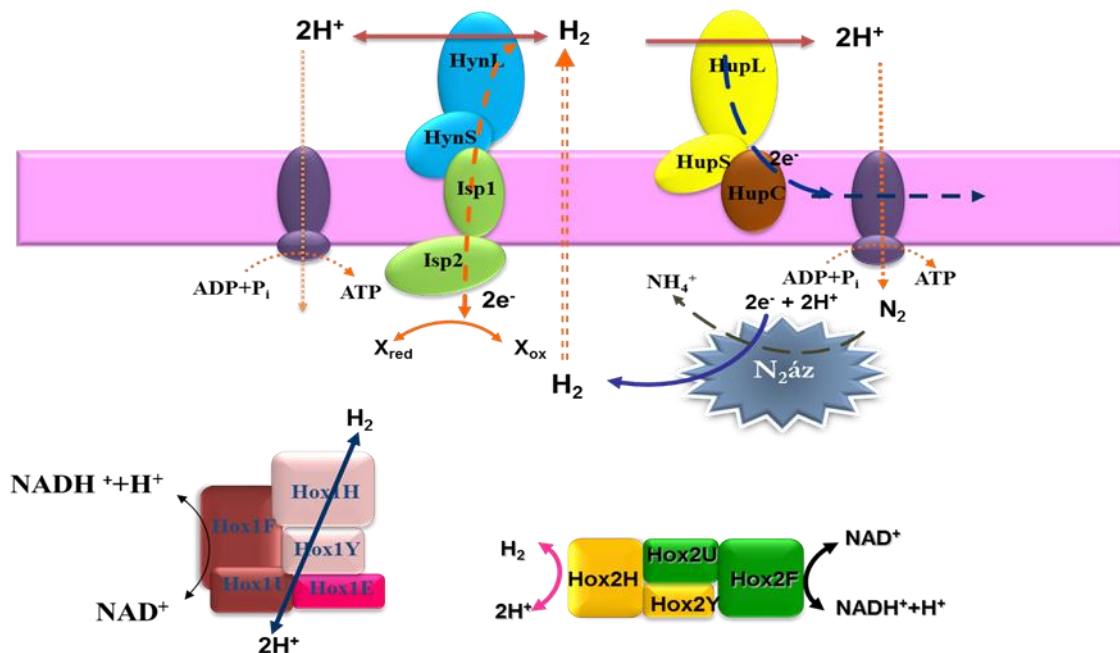
---

### 3.3.1. A *T. ROSEOPERSICINA* HIDROGENÁZAI

---

A *T. roseopersicina* azon kevés mikroorganizmusok közé tartozik, mely többféle [NiFe] hidrogénázzal rendelkezik. Négy, funkcionálisan aktív hidrogénázt tartalmaz (Hyn, Hup, Hox1,

Hox2) (Kovács 2005c, Maróti 2010), valamint egy további, hidrogenázokat kódoló operont is azonosítottak a genomjában, viszont ezekről a génekről (*hupTUV*) nem expresszálódnak aktív enzimek (Kovács 2005b). Más baktériumokban a *T. roseopersicina* *hupUV* által kódolt enzim homológjai (HupUV a *R. capsulatus*-ban (Dischert 1999) és HoxBC a *R. eutropha*-ban (Lenz 2002)) a Hup típusú enzimek expresszióját szabályozzák a sejt környezetében lévő hidrogén mennyiségétől függően. A *T. roseopersicina* négy, aktív hidrogenáza különbözik egymástól *in vivo* szerepükben (Hup hidrogén felvevő, Hyn, Hox1 és Hox2 kétirányú enzim), sejten belüli elhelyezkedésükben (Hyn és Hup membránkötött, Hox1 és Hox2 szolubilis) és felépítésükben (a Hup három, a Hyn és a Hox2 négy, a Hox1 öt alegységes) (Rákhely 1998) (4. ábra).



4. ábra: A *T. roseopersicina* [NiFe] hidrogenázainak és nitrogénázának elhelyezkedése

### 3.3.1.1. A MEMBRÁNKÖTÖTT Hyn HIDROGENÁZ

A *T. roseopersicina*-ban elsőként a Hyn hidrogenázt azonosították (korábbi nevén Hyd (Rákhely 1998)). Ez egy membránkötött, kétirányú enzim, mely kiemelkedő stabilitási tulajdonságai miatt (hővel, oxigénnel és proteázokkal szembeni stabilitás) (Gogotov 1976, Kovács 1988, Kovács 1990) a biotechnológiai kutatások középpontjába került. Heterotetramer szerkezetű, a kis (HynS) és nagy alegység (HynL) egy Isp1 és egy Isp2 fehérjével alkot komplexet.

Génjeik elhelyezkedése igen szokatlan, az általános hidrogenáz operon-elrendeződéssel ellentétben a kis és nagy alegységet kódoló gének nem közvetlenül követik egymást, hanem az *isp1* és *isp2* géneket fogják közre (Rakhely 1998). Mind az *Isp1*, mind az *Isp2* szükséges a Hyn hidrogenáz *in vivo* aktivitásához, míg *in vitro* körülmények között feladatukat mesterséges elektronakceptor vagy -donor képes volt helyettesíteni (Palágyi-Mészáros 2009). Az *Isp* fehérjék nagy valószínűséggel szerepet játszanak a Hyn hidrogenázhoz kötődő elektrontranszferben, és összekapcsolják ezt az enzimet a sejten belüli kénanyagcserével.

---

### 3.3.1.2. A MEMBRÁNKÖTÖTT Hup HIDROGENÁZ

---

A Hup hidrogenáz szintén membránkött, és legfőbb feladata a környezetben lévő, illetve a nitrogenáz enzimszisztéma működése során termelt hidrogén visszavétele (hydrogen uptake) (Vignais 2001), így ez az enzim nélkülözhetetlen a *T. roseopersicina* hidrogénfüggő növekedéséhez (Palágyi-Mészáros 2009). A kis (HupS) és nagy (HupL) alegységeken kívül a HupC fehérje (egy *b* típusú citokróm) is része ennek az enzimszisztémának (Palágyi-Mészáros 2009). Ez utóbbi feladata az elektronok továbbítása a Hup hidrogenázról a kinonraktár irányába. Deléciója jelentősen csökkenti a Hup hidrogenáz *in vivo* hidrogénbontó aktivitását, míg *in vitro* aktivitása nem változik. A Hup nem annyira stabil enzim, mint a Hyn, expressziója nemcsak az oxigénre és a sejt redox állapotára érzékeny, hanem kapcsolatban van a Hox1 hidrogenáz expressziójával is, ugyanis a Hox1 enzim hiányában a Hup expressziós szintje is jelentősen lecsökkent (Palágyi-Mészáros 2009). Csoportunk korábbi kutatásai bizonyítják, hogy *in vivo* hidrogénvisszavevő aktivitása nagyobb 2g/l tioszulfát koncentráció mellett, mint a szokásos 4g/l tioszulfátnál, ekkor ugyanis - feltételezésünk szerint - a sejtmembrán eltérő redox állapotba kerül.

A hup operonban a *hupSLC* géneken kívül több olyan kisegítő gén (*hupDHIR*) is azonosítható, amelyek szükségesek a Hup hidrogenáz bioszintéziséhez, működéséhez.

---

### 3.3.1.3. A CITOPLAZMATIKUS Hox1 HIDROGENÁZ

---

Az öt alegységes Hox1 hidrogenázt a *hox1EFUYH* operon kódolja. Ez a heteropentamer felépítés a cianobaktériumokban előforduló szolubilis hidrogenázokra jellemző (Vignais 2007). Az enzim a struktúrfehérjéken (Hox1YH) kívül, melyek az aktivitásért felelősek, tartalmaz egy

két alegységből álló diaforázt (Hox1FU), amely a NAD<sup>+</sup>/NADH redox reakciót katalizálja (Friedrich 1993, Rákhely 2004). Az enzimkomplex ötödik fehérjéje a cianobakteriális Hox hidrogenázokra jellemző Hox1E (Schmitz 2002, Tamagnini 2002, Rákhely 2004, Palágyi-Mészáros 2009). Deléciónja megszünteti a Hox1 hidrogenáz *in vivo* aktivitását, viszont nincs hatással az *in vitro* aktivitásra, így feltehetően szerepe a hidrogenáz felé történő elektrontranszportban van (Rákhely 2004).

A Hyn hidrogenázhoz hasonlóan, ez az enzim is képes katalizálni a hidrogén oxidációját, és a protonok redukcióját a sejt redox állapotától függően, működése erősen kapcsolódik a sejt kénmetabolizmusához (Rákhely 2004, Rákhely 2007).

---

#### 3.3.1.4. A CITOPLAZMATIKUS Hox2 HIDROGENÁZ

---

A Hyn hidrogenázhoz hasonlóan, heterotetramer (Hox2FUYH) felépítésű a *T. roseopersicina* utolsóként felfedezett [NiFe] hidrogenáza, a Hox2 (Maróti 2010). Csakúgy, mint a Hox1 esetében, a Hox2FU a NAD<sup>+</sup>/NADH redox reakció katalizálásáért, míg a Hox2YH a hidrogenáz aktivitásért felelős alegységek. Viszont a Hox1-től eltérően, nem található meg a cianobakteriális típusú Hox enzimekre jellemző ötödik, HoxE alegység. Az enzim aktivitása a sejtnövekedés egy kései fázisában mérhető, a tápoldat alacsony tioszulfát tartalma mellett. Továbbá azt is sikerült bebizonyítani, hogy a Hox2 glükózt használ közvetlen elektrondonorként (Maróti 2010).

---

#### 3.3.2. A *T. ROSEOPERSICINA* HIDROGENÁZAINAK ÉRÉSE

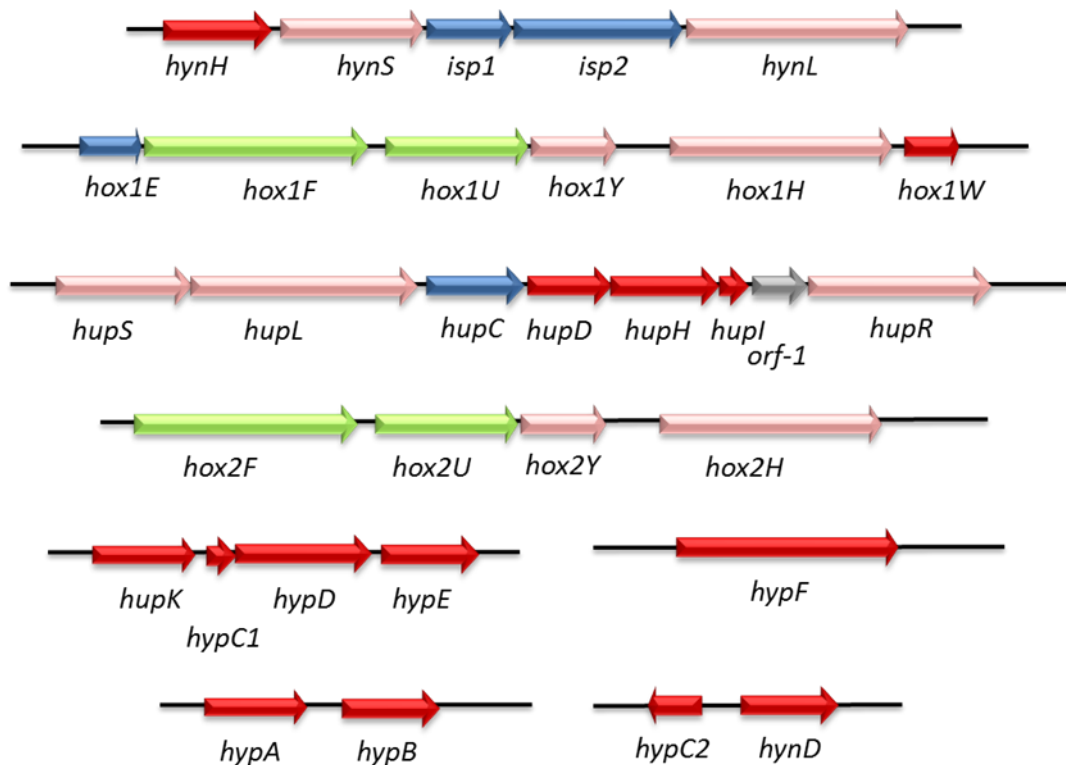
---

Mivel a hidrogenázok ősi enzimek, és elsődleges szerkezetük jól konzervált, ezért valószínűsíthető, hogy a [NiFe] hidrogenázok érésére vonatkozó alapelvek (lásd: 3.2.1.2. fejezet) érvényesek a *T. roseopersicina* hidrogenázaira is. Azonban vannak eltérések az alapmodelltől, lévén, hogy ez az organizmus négy, különböző metabolikus szereppel bíró, aktív [NiFe] hidrogenázt expresszál. Emellett a törzs számos, eltérő körülmény között is képes a növekedésre (lásd: 3.3 fejezet).

A [NiFe] hidrogenáz kisegítő fehérje génjeinek egy részére jellemző, hogy a hidrogenáz struktúrgénjeinek közelében helyezkednek el. Ebből kiindulva, *T. roseopersicina*-ban sikerült is



azonosítani öt kisegítő gént: a *hupDHI*-t a HupSL géncsoport közelében, amelyeket szekvenciahomológia alapján azonosítottak (Colbeau 1994), a *hynH*-t a Hyn operon első tagjaként és a Hox1 géntől 3' irányban a *hoxW* gént (5. ábra).



**5. ábra A *T. roseopersicina* NiFe hidrogenáz struktúr- és kisegítőgénjeinek (piros nyíl) elhelyezkedése**

A hidrogenáz struktúrgének közelében több kisegítő gén nem található. Viszont számos - az irodalomból ismert - kisegítő fehérje génje hiányzik, ezek a genomban szétszórtan helyezkednek el. Ez nem ritka más mikroorganizmusok esetében sem, azonban a *T. roseopersicina*-ban a hidrogenázok nagy száma miatt a szokásosnál több kisegítő gént kellett megtalálnunk és jellemeznünk. Ezért laboratóriumunkban optimalizáltak egy Tn5 alapú transzpozonos mutagenézis rendszert *T. roseopersicina*-ra, és ennek segítségével sikerült is azonosítani hét olyan gént (*hypC1*, *hypC2*, *hypD*, *hypE*, *hypF*, *hynD* és *hupK*) (5. ábra), amelyek vagy specifikusan, vagy pleiotróp módon játszanak szerepet a [NiFe] hidrogenázok bioszintézisében (Fodor 2001, Maróti 2003). A *T. roseopersicina* genomszekvenálása során sikerült rátalálni a *hypA* és *hypB* génekre is (nem közölt adat).

A HypD, HypE és HypF fehérjék mutációs analízise bebizonyította, hogy mindhárom segédfehérje nélkülözhetetlen a *T. roseopersicina* összes hidrogenázának éréséhez, ez összhangban van az általános modellel (Fodor 2001, Maróti 2003). Azonban a HypC1 és HypC2 fehérjék jelenléte eltérést mutat ettől a modelltől. Mindkét HypC kölcsönhat a Hyn és a Hox1 hidrogenáz nagy alegységeivel (a HynL-lel és a Hox1H-val), míg a HypC2 a HypD és a HupK kiegészítő fehérjékkel is (Maróti 2010a). Az egyik HypC fehérje nyitott konformációban tartja a hidrogenáz nagy alegységet, hogy más fehérjék be tudják építeni a fémcentrumot. A másik HypC pedig a HypD fehérjével hat kölcsön (Blokesch 2004, Maróti 2010a). A fémcentrum  $\text{Fe}(\text{CN})_2\text{CO}$  csoport kialakításában a HypC12, HypD, HypE és HypF kiegészítő fehérjék a vesznek részt. A nagy alegység érésének utolsó lépéseként, a fehérje C-terminális peptidjének levágására kerül sor egy, az adott hidrogenázra specifikus endopeptidáz segítségével. *T. roseopersicina*-ban ezek a következők: a HynL-re specifikus HynD, a HupL-re specifikus HupD és a Hox1H-ra specifikus HoxW.

---

#### 3.3.2.1. A HupK KISEGÍTŐ FEHÉRJE JELLEMZÉSE

---

A HupK fehérjének, illetve ennek génjének előfordulása nem univerzális. Eddig csak viszonylag kevés baktériumban találták meg (Cammack 2001), főleg olyanokban, melyek képesek a levegő nitrogénjének a megkötésére. A *hupK* gén minden eddig megismert, Hup-típusú hidrogenázt tartalmazó organizmusban a *hup* operon utolsó génjeként került elő. Ezzel szemben *T. roseopersicina*-ban a *hupK* a *hup* operontól teljesen független helyen, a *hypC1* és *hypD* génektől 5' irányban található (5. ábra). A HupK vagy annak homológja nincs jelen *E. coli*-ban, melynek a 3-as hidrogenázára létrehozott érési modell a legelfogadottabb. Mivel a HupK fehérje az általános érési modellben nem szerepel, ezért érésben betöltött szerepének meghatározása kiemelkedő fontosságú. A szekvencia adatbázisok átvizsgálása után megállapítható, hogy a HupK vagy annak homológja mindig olyan organizmusokban van jelen, ahol legalább egy membránkötött hidrogenáz található. A *hupK* deléciós mutáns *T. roseopersicina* törzs vizsgálata alapján elmondható, hogy a HupK fehérje a membránkötött hidrogenázok (HynSL és HupSL) éréséhez szükséges, míg a szolubilis Hox1 hidrogenáz aktivitása a *hupK* mutáns törzsben változatlan marad (Maróti 2003). A HupK fehérje aminosav sorrendjét részletesebben megvizsgálva azt a további érdekességet találjuk, hogy a HupK-ban meglévő bizonyos szekvencia motívumok a [NiFe]

hidrogenázok nagy alegységében is megtalálhatóak (Imperial 1993). Míg az N- és C-terminálison konzervált régiók figyelhetők meg, addig a fehérjék középső része sokkal változékonyabb. A [NiFe] hidrogenázok nagy alegységében lévő két darab CXXC motívum nélkülözhetetlen az aktivitásukhoz, hiszen a cisztein oldalláncok biztosítják a [NiFe] aktív centrum rögzítését (Przybyla 1992, Volbeda 1995). A HupK és a vele homológ HoxV fehérjékben, a nagy alegységben megtalálható négy ciszteinből az elsőt és az utolsót fenil-alaninok (*Tr* HupK-ban az 51-es és a 381-es pozícióban) helyettesítik (Ludwig 2009). A *T. roseopersicina*-ból származó HupK fehérje nem túl nagyfokú azonosságot mutat más mikroorganizmusokból származó HupK illetve HoxV fehérjével: 33% a *R. eutropha* HoxV-vel, 31% a *R. capsulatus* HupK-val és 28% a *B. japonicum* HoxV-vel. A *R. eutropha*-ban lévő HoxV kisegítő fehérjéről FTIR és ICP-OES spektroszkópiai analízissel bebizonyították, hogy CO- és CN<sup>-</sup> ligandumokat, valamint vasat tartalmaz. A fehérje további mutagenézis vizsgálatával kiderítették, hogy a már korábban említett két cisztein hiányában a fehérje nem volt képes sem a CO-, sem a CN<sup>-</sup> ligandum megkötésére. Az eredmények alapján azt a következtetést vonták le, hogy a HoxV egyfajta közvetítő szerepet játszik a membránkött hidrogenáz aktív centrumának érésében (Ludwig 2009). Figyelembe véve a szekvencia azonosságokat, feltételezhető, hogy a HupK/HoxV feladata hasonló, de előfordulhat funkcionális különbség is.

---

## 4. CÉLKITŰZÉSEK

---

Ahhoz, hogy a hidrogenázokat a jövő biotechnológiájában biokatalizátorként használhassuk, értenünk kell a szerkezetük és a funkciójuk közötti összefüggéseket, meg kell ismernünk a felépítésüket és a bioszintézisük folyamatát. A *T. roseopersicina* [NiFe] hidrogenázainak érésében számos kisegítő fehérje vesz részt, szerepük az aktív centrum szerkezetének kialakítása, a nagy alegység proteolitikus hasítása. A *T. roseopersicina*-ban eddig felfedezett 14 kisegítő fehérje közül a HupK feladata még tisztázatlan, ezért munkám során célul tűztem ki ennek a fehérjének a részletes vizsgálatát. A *R. eutropha*-ban lévő, HupK-val homológ HoxV fehérjéről már bebizonyították, hogy a  $\text{Fe}(\text{CN})_2\text{CO}$  csoportot juttatja a nagyalegységhez, ami felvetett néhány kérdést: A két fehérje közötti kismértékű hasonlóság elegendő-e ahhoz, hogy ugyanúgy működjenek és ugyanazt a feladatot lássák el különböző fajokban? A két fehérjében, konzerváltan megtalálható aminosavaknak van-e szerepük a hidrogenáz érésében?

A felmerült kérdések megválaszolásához a következő célokat tűztem ki:

- Heterológ komplementációs kísérletben megvizsgálni, hogy a HupK képes-e helyettesíteni a HoxV kisegítő fehérje hiányát *R. eutropha*-ban, valamint, hogy a HoxV részt vesz-e a Hup és/vagy a Hyn hidrogenáz érésében *T. roseopersicina*-ban.
- A HupK fehérjében megfigyelt erősen konzervált szekvenciamotívum részletes vizsgálatát annak kiderítésére, hogy ez a régió felelős-e a fehérje funkciójáért.
- A HupK konzervált aminosavaiban mutáns törzsek elkészítését irányított mutagenézis módszerrel.
- Az aminosav cserét tartalmazó HupK hatásának vizsgálata a Hup hidrogenáz érésére, az enzim aktivitásán keresztül.

Egyes bíbor, nem-kén baktériumok redukált szerves szubsztrátokat (pl. szerves savak) használnak hidrogéntermelésre. A különböző szerves vegyületekből történő hidrogéntermelés vizsgálatáról, nem-kén baktériumok esetén, már számos tanulmány született, azonban nagyon keveset tudunk a kénbaktériumok szerves sav hasznosításáról. Ezért munkám során célul

tűztem ki a fotoszintetikus *T. roseopersicina*, mint bíbor, kénbaktérium, hidrogén-metabolizmusának tanulmányozását, különböző elektrondonorok alkalmazásával.

Ezen céloom elérése érdekében a következőket terveztem:

- Megvizsgálni, hogy az ecetsav, a piroszólósav, a borostyánkősav és a tejsav milyen hatással vannak a biomassza növekedésre és a hidrogéntermelésre.
- Összehasonlítani a Hox1 hidrogenáz és a nitrogenáz enzimek hidrogéntermelését a különböző szerves savak jelenlétében.
- A fermentáció során használt szerves savak mennyiségének nyomon követésével meghatározni, hogy a sejtek milyen hatékonysággal metabolizálják a szubsztrátot.

# 5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

## 5.1 BAKTÉRIUMTÖRZSEK ÉS PLAZMIDOK

### 5.1.1. *E. COLI*, *T. ROSEOPERSICINA* ÉS *R. EUTROPHA* TÖRZSEK MEGNEVEZÉSE ÉS LEÍRÁSA

Törzsek	Genotípus	Referencia
<b><i>Thiocapsa roseopersicina</i></b>		
DHKW426	$\Delta hupK$	(Maróti 2003)
W400	pB6HupK plazmid a DHKW426 törzsben	(Fodor 2004)
M539	$\Delta hypF$	(Fodor 2001)
GB1121	$\Delta hynSL, \Delta hupSL$	(Rákhely 2004)
GB1131	$\Delta hynSL, \Delta hox1H$	(Palágyi-Mészáros 2009)
<b><i>Escherichia coli</i></b>		
S17-1( $\lambda$ pir)	294 ( <i>recA pro res mod</i> ) $Tp^r, Sm^r$ (pRP4-2-Tc:: $\mu$ -Km:: $Tn7$ ), $\lambda$ pir	(Herrero 1990)
XL1-Blue MRF'	$\Delta(mcrA)183, \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173, endA1, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1 lac$ [F' <i>proABlacI<sup>q</sup>Z</i> $\lambda$ M15 $Tn10$ (Tc <sup>r</sup> )] <sup>c</sup>	Stratagene
<b><i>Ralstonia eutropha</i></b>		
HF388	SH-, $\Delta hoxH$	(Bernhard 1996)
HF541	$\Delta hoxV$ a HF388 törzsben	(Bernhard 1996)

## 5.1.2. PLAZMIDOK MEGNEVEZÉSE ÉS LEÍRÁSA

Vektorok	Genotípus	Referencia
pBluescriptSK (+)	ColE1, Amp <sup>r</sup>	Stratagene
pB6HupK	<i>hupK</i> gén a pMHE6crtKm vektorban, Km <sup>r</sup>	(Fodor 2004)
pBhupK	<i>hupK</i> gént tartalmazó <i>Xba</i> I- <i>Xho</i> I fragment a pBluescriptSK(+) plazmidban	Ez a munka
pDSK5crt-Km		Ez a munka
pBRHupK	<i>hupK</i> gén a pBBR1MCS-5, Gm <sup>r</sup>	(Maróti 2003)
pHRP309	IncQ ,mob <sup>+</sup> , Gm <sup>r</sup>	(Parales 1993)
pK18 <i>mobsacB</i>	bhr vektor irányított mutagenézishez, Km <sup>r</sup> , sacB <sup>+</sup>	(Schäfer 1994)
pDHuK	a <i>hupK</i> upstream és downstream homolog régiója pK18 <i>mobsacB</i> vektorban, Km <sup>r</sup>	(Maróti 2003)

## 5.2. BAKTÉRIUMOK TENYÉSZTÉSE

### 5.2.1. AZ *E. COLI* NÖVESZTÉSI KÖRÜLMÉNYEI

Az *E. coli* sejteket 37°C-on LB folyadékban vagy LB lemezen (LB + 1,5% agar) tartottam fenn. Az *E. coli* tenyésztésénél használt antibiotikumok és koncentrációjuk: lemezen és folyadékban egyaránt 25µg/ml kanamicin, 100µg/ml ampicillin, 15µg/ml tetraciklin.

**Az *E. coli* sejtek növesztéséhez használt tápoldatok:**

**LB:** 1 literre: 10g tripton, 5g élesztőkivonat, 10g NaCl

**SOB:** 1 literre: 20g tripton, 5g élesztő kivonat, 0,5g NaCl

### 5. 2. 2. A *T. ROSEOPERSICINA* NÖVESZTÉSI KÖRÜLMÉNYEI

A *T. roseopersicina* törzseket 25-28°C-on folyamatos megvilágítás mellett, teletöltött csiszolt dugós üvegekben, Pfennig féle (PC) tápoldatban növesztettem (Pfennig 1983). A

hidrogenáz aktivitásmérésekhez leoltott sejteket 5 $\mu$ M-os végkoncentrációra kiegészített NiCl<sub>2</sub>-ot tartalmazó PC tápoldatban növesztettem teljesen anaerob körülmények között. A nitrogénáz aktivitásméréshez a nitrogén kötő körülmények biztosítása érdekében NH<sub>4</sub>Cl-ot nem tettem a tápoldatba (NC tápoldat). Alkalmazott antibiotikum koncentrációk: 25 $\mu$ g/ml kanamicin, 50 $\mu$ g/ml eritromicin, 25 $\mu$ g/ml sztreptomycin, 25 $\mu$ g/ml gentamicin.

**Az *T. roseopersicina* sejtek növesztéséhez használt tápoldatok:**

**PC** (Pfennig-féle tápoldat): 1 literre: 20g NaCl, 1g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1g MgCl<sub>2</sub>, 1g KCl, 1g NH<sub>4</sub>Cl, 2g NaHCO<sub>3</sub>, 4g Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 20 $\mu$ l B<sub>12</sub> vitamin (1mg/ml), 1ml 20mM Fe-EDTA, 1ml mikroelem oldat

**Mikroelem oldat:** 1 literre: 2975mg Na<sub>2</sub>-EDTA, 300mg H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub>, 200mg CaCl<sub>2</sub>·6 H<sub>2</sub>O, 100mg ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 30mg MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 30mg Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 20mg NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 10mg CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O

**NC** (nitrogénfixáló tápoldat): 1 literre: 20g NaCl, 1g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1g MgCl<sub>2</sub>, 1g KCl, 2g NaHCO<sub>3</sub>, 2g Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 20 $\mu$ l B<sub>12</sub> vitamin (1mg/ml), 1ml 20mM Fe-EDTA, 1ml mikroelem oldat

---

### 5. 2. 3. A *R. EUTROPHA* NÖVESZTÉSI KÖRÜLMÉNYEI

---

A *R. eutropha* törzseket 30°C-on FGN tápoldaton tartottam fenn (Schlegel 1961), a hidrogenáz aktivitásmérésekhez a törzseket SL-6 mikroelemoldattal kiegészített FGN tápoldaton növesztettem (Dernedde 1996). Alkalmazott antibiotikum koncentráció: 50 $\mu$ g/ml gentamicin.

**A *R. eutropha* sejtek növesztéséhez használt tápoldatok:**

**FGN tápoldat:** 40mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,02% MgSO<sub>4</sub>, 0,2% NH<sub>4</sub>Cl, 0,001% CaCl<sub>2</sub>, 0,0005% FeCl<sub>3</sub>, 0,2% fruktóz, 0,2% glicerin

**SL-6 mikroelemoldat:** 1 literre: 100mg ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 30mg MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 300mg H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 200mg CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 10mg CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 20mg NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 30mg Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O



---

## 5.3 RNS-SEL VÉGGZETT MUNKÁK

---

---

### 5.3.1. RNS IZOLÁLÁS

---

Az RNS izoláláshoz a *T. roseopersicina* sejteket anaerob, nitrogénfixáló körülmények között növesztettem a 2., 3., 4., 5., 6. és 9. napig. 5ml sejtet centrifugáltam (13 000rpm, 2 perc). A csapadékot ezután 300µl SET pufferben szuszpendáltam fel, majd 300µl SDS puffert adtam hozzá. Az elegyet óvatosan fel-le forgatva az Eppendorf csövet homogenizáltam, majd 500µl telített NaCl oldatot adtam hozzá. Ezt követően a mintát 13 000rpm-en 10 percig centrifugáltam, majd a tiszta felülúszót előkészített Eppendorf csőbe pipettáztam át. Az RNS-t a mintatérfogató 70%-ának megfelelő mennyiségű izopropanollal csaptam ki, majd 20 percen át 13000rpm-en centrifugáltam. A felülúszó leöntését követően a csapadékot 1ml 70%-os alkohollal mostam, majd 2 percen át 13 000rpm-en centrifugáltam. A felülúszó leszívását követően az RNS-t szárítottam, majd 20µl vízben (DEPC kezelt) vettem fel.

#### **Az RNS izoláláshoz használt oldatok:**

**SET puffer:** 20% szukróz, 50mM EDTA (pH=8,00), 50mM Tris-HCl (pH=8,00)

**SDS puffer:** 20% SDS, 1% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH=4,80

---

### 5.3.2. DNÁZ I KEZELÉS

---

Az RNS mintákat 10x DNase I Reakció Puffer (Invitrogen) és 1 U/µl DNase I Amp Grade (RNase-free, Invitrogen) jelenlétében 15 percig inkubáltam szobahőmérsékleten. A reakciót 65°C-os 10 perces hőkezeléssel állítottam le EDTA (Invitrogen) jelenlétében.

---

### 5.3.3. REVERZ TRANZSKRIPCIO

---

A reverz transzkripcióhoz az MMLV Reverse Transcriptase (Promega) enzimet használtam a gyártó cég útmutatásainak megfelelően: 1µg DNáz I kezelt totál RNS-t használva templátként. Az RNS-t 0,5µg random hexamer (Fermentas) jelenlétében, 15 µl végtérfogatra kiegészítve 70°C-on inkubáltam 5 percig, majd jégen lehűtöttem. Ezt követően 8mM végkoncentrációnak megfelelő dNTP-t, valamint 5µl 5x MMLV (Promega) puffert adtam az elegyhez. A reakcióelegyet 200U MMLV (Promega) mellett inkubáltam 1 órán át 37°C-on.

#### 5.3.4. KVANTITATÍV REAL-TIME PCR

A reverz transzkripcióban keletkezett cDNS szolgálta templátként a kvantitatív PCR során, melyben a nitrogénáz  $\alpha$  génre specifikus "onitalfafwq" és "onitalfarevq", a nitrogénáz  $\beta$  génre specifikus "onitbetafwq" és "onitbetarevq", valamint a dinitrogénáz génre specifikus "odinitfwq" és "odinitrevq" oligonukleotidokat használtam. Az abszolút kvantifikáláshoz kalibrációs görbét készítettem a gének PCR termékeinek tízes léptékű hígítási sorozatával: 0.0001-10ng/ $\mu$ l koncentráció-tartományban. A PCR elegy, 25 $\mu$ l végtérfogatra a következőképpen állt össze: 12,5 $\mu$ l 2x Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 2,5 $\mu$ l forward és reverz primer (10pM), 9 $\mu$ l nukleáz mentes víz és 1 $\mu$ l cDNS. A keletkezett termék fluoreszcenciájának detektálását az Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) 7500 real-time PCR géppel végeztem. A következő programot alkalmaztam: 95°C 10 perc, 95°C 15 másodperc és 60°C 1 perc 40 cikluson át; az olvadási pont meghatározáshoz pedig: 95°C 15 másodperc, 60°C 1 perc, 95°C 15 másodperc, 60°C 15 másodperc.

A kvantitatív real-time PCR során használt oligonukleotidok	
Név	Szekvencia (5'→3')
<b><i>onitalfafwq</i></b>	ATCTTCGCCCGCGATATG
<b><i>onitalfarevq</i></b>	GGGCCTGCATCTTCTTCC
<b><i>onitbetafwq</i></b>	GCTTTGTCCGGCAGCCATAC
<b><i>onitbetarevq</i></b>	TGAAGTAGCGGACGATCCC
<b><i>odinitfwq</i></b>	TGCAGCCAAGGTCGTCAA
<b><i>odinitrevq</i></b>	CCGCCGCGTCTTTGATAG

## 5.4. DNS-MANIPULÁCIÓS MUNKÁK

---

### 5.4.1. PLAZMID DNS TISZTÍTÁSA *E. COLI*-BÓL

---

A plazmid izoláláshoz 5ml antibiotikum tartalmú LB tápoldatba oltottam le egy telepet a meghatározott baktérium törzsből. A sejteket egész éjszakán át 37°C-on rázatva növesztettem. Másnap ebből a tenyészetből plazmid izoláló kittel tisztítottam DNS-t (Sigma Kat. szám: PLN350). A tenyészetet 1,5ml-es centrifugacsőben centrifugáltam 12 000rpm-en 5 percig. A sejteket 200µl Puffer P1-ben szuszpendáltam fel, majd 200µl Puffer P2-t adtam hozzá, és keverés után 5 percig inkubáltam szobahőmérsékleten. Ezt követően 350µl Puffer P3-at adtam hozzá, és 10 percig jégen tartottam, majd centrifugáltam 13 200 rpm-en, 10 percig. A DNS-tisztító oszlopra először 500µl előkészítő oldatot vittem fel, centrifugáltam, majd pedig a sejtlyázatot mértem rá az oszlopra. Centrifugálás után a nem specifikusan kötődő anyagokat 750µl mosó pufferrel lemostam, majd a teljesen kiszáritott oszlopra 50µl desztillált vizet tettem. Pár perc várakozás után tiszta Eppendorfba centrifugáltam a tisztított DNS-t.

### 5.4.2. AGARÓZ GÉLELEKTROFORÉZIS

---

Az analitikai és preparatív célokból végzett gélelektroforézisekhez 1%-os, 0,1 µg/ml etídium-bromidot tartalmazó agaróz gélt használtam 1xTAE pufferben (4mM TRIS-acetát, 1 mM EDTA pH = 8,00), 70-90 V futtatási feszültséggel.

### 5.4.3. FRAGMENT-IZOLÁLÁS

---

Preparatív agaróz gélelektroforézis után a gélből a kívánt DNS fragmentet steril pengével vágtam ki és egy 1,5ml-es centrifugacsőbe helyeztem. A DNS izolálását a gélből a Fermentas DNS extrakciós kitjével (Kat. szám: K0513) végeztem. A kivágott, kb. 200µl-es géldarabhoz háromszoros mennyiségű NaI oldatot adtam és az agaróz oldódásáig 55°C-on rázattam. 5µl szilikaport adtam az oldathoz és 5 percig 55°C-on inkubáltam, pár percenként felrázva. Egy perces centrifugálás (13 000 rpm) után az üledéket átmostam 500µl mosó pufferrel, majd újabb 1 percig centrifugáltam 13 000 rpm-en. A mosást még kétszer megismételtem, majd az utolsó fugálás után az üledéket szobahőmérsékleten szárítottam.

Ezután a szilikaporra 20 $\mu$ l desztillált vizet mértem és 55°C-os termosztátban inkubáltam 10 percre. Legvégül a szuszpenziót addig centrifugáltam (13 000 rpm-en), míg szilikapor mentes felülúszót nem kaptam. Az izolált DNS mintát a felhasználásig -20°C-on tároltam.

---

#### 5.4.4. EMÉSZTÉSEK RESTRIKCIÓS ENZIMEKKEL

---

A restrikciós emésztéseket Fermentas enzimekkel végeztem, az enzimek saját, gyári pufferében a cég instrukciói alapján.

---

#### 5.4.5. ALKALIKUS FOSZFATÁZ KEZELÉS

---

A Fermentas CIAP enzimet saját gyári pufferében használtam. 5' túlnyúló vég defoszforilálásához 37°C-on 30 percen át inkubáltam a DNS-t, majd 5 percre 85°C-on való inkubálással állítottam le a reakciót.

---

#### 5.4.6. POLINUKLEOTID KINÁZ KEZELÉS

---

A DNS molekulák 5' végi foszforilálását Fermentas polinukleotid kinázzal végeztem (1x polinukleotid kináz puffer A-ban, 5-10mM rATP, 30 perc 37°C-os inkubálás). Az enzimet 10 percre, 75°C-on hőinaktiváltam.

---

#### 5.4.7. LIGÁLÁS

---

A beépítendő DNS fragmentumot 2-10-szeres feleslegben adtam a vektorhoz. 2U Fermentas T4 DNS-ligáz enzimet alkalmaztam 1x T4 DNS-ligáz pufferben 18-20°C-on egy éjszakán át végezve a reakciót.

---

#### 5.4.8. KOMPLEMENTÁLÓ KONSTRUKCIÓK KÉSZÍTÉSE

---

---

##### 5.4.8.1. pREV

---

A pDSK5Crt-Km plazmid tartalmazza az egész, pMHE5CrtKm vektorból származó expressziós kazettát, a *T. roseopersicina*-ból származó *crtD* promóterrel és az *E. coli*-ből származó T7 promóterrel együtt. A *hoxV* gént az "*ohoxV\_fw*" és az "*ohoxV\_rev*"

oligonukleotidokkal sokszoroztam fel, Phusion HF DNA polimeráz enzim (Thermo Scientific) segítségével. A PCR terméket *EcoRI* és *BamHI* restrikciós endonukleázokkal emésztettem, majd egy *EcoRI-BamHI*-emésztett, alkalikus foszfatázzal kezelt pDSK5Crt-Km vektorba ligáltam, létrehozva a pREV plazmidot, melyet szekvenálással ellenőriztem.

A <i>hoxV</i> gén sokszorozásához használt oligonukleotidok	
Név	Szekvencia (5'→3')
<b><i>ohoxV_fw</i></b>	CTGAATTCCGTTATGACTCGGG
<b><i>ohoxV_rev</i></b>	CTGAATTCCGTTATGACTCGGG

#### 5.4.8.2. pTRK

A pBRHupK-ból (Maróti 2003) származó, 3,3kb nagyságú *HindIII-KpnI* fragmentumot, amely tartalmazza *T. roseopersicina hupK* génjét, ligáltam egy *HindIII-KpnI*-emésztett, alkalikus foszfatázzal kezelt pHRP309 (Parales 1993) vektorba, létrehozva a pTRK plazmidot. A konstrukciót szekvenálással ellenőriztem.

#### 5.4.9. KÉMIAI KOMPETENS SEJT-KÉSZÍTÉS

Az XL1-Blue MRF' és S17-1 λpir *E. coli* sejteket 50ml SOB tápoldatban OD<sub>600</sub> = 0,4-0,6-ig növesztettem 22°C-on, ezt követően a kultúrákat 10 percig jégen hűtöttem, majd 2500xg-n, 4°C-on 10 percig centrifugáltam. Az összegyűlt sejteket jégen tartva 16ml TB pufferben felszuszpendáltam, és újra 2500xg-n, 4°C-on 10 percig centrifugáltam. A sejteket 4ml TB pufferben felszuszpendáltam, 300μl DMSO-t adtam a sejszuszpenzióhoz, amit ezután 10 percig jégen inkubáltam. Ezt követően 100μl-enként, előre lehűtött Eppendorf csövekbe szétosztva, folyékony N<sub>2</sub>-ben fagyasztottam le a kompetens sejteket, majd -80°C-on tároltam őket (Inoue 1990).

**A kémiai kompetens sejt készítéshez használt oldat:**

**TB puffer:** 10mM PIPES, 5mM CaCl<sub>2</sub>, 250mM KCl, 55mM MnCl<sub>2</sub>, pH = 6,70

#### 5.4.10. KÉMIAI TRANSZFORMÁLÁS

---

Az eljárás során a transzformálandó DNS-t 100 $\mu$ l, jégen felolvasztott *E. coli* kompetens sejthez adtam, melyet ezután 30 percig jégen tartottam. A hősokkot (42°C, 40 másodperc) követően a sejtekhez 900 $\mu$ l SOB-ot adtam, 1 órát 37°C-on rázattam, végül a megfelelő antibiotikummal kiegészített LB lemezre szélesztettem.

**Az *E. coli* transzformálásához használt oldat:**

**SOB:** 1 literre: 20g tripton, 5g élesztő kivonat, 0,5g NaCl

#### 5.4.11. KONJUGÁLÁS *T. ROSEOPERSICINA*-BA

---

A *T. roseopersicina*-t a konjugációhoz 28°C-on OD<sub>650</sub> = 1,8-ig, a mobilizálandó plazmidot tartalmazó S17-1  $\lambda$ pir *E. coli*-t 37°C-on a megfelelő antibiotikum jelenlétében OD<sub>600</sub> = 0,6-ig növesztettem, majd centrifugálás után, sóoldatban összekevertem. Az így kapott sejteket Pfennig-féle (Pfennig 1983) konjugációs táptalajra cseppentettem. Csak a donor, és csak a recipiens törzseket tartalmazó kontroll kísérleteket is elvégeztem. Egy éjszakán át fényen, levegőn, 28°C-on inkubáltam ezeket a lemezeket. Másnap, hígítási sort készítve szelektív (PCA) lemezre szélesztettem, melyeket Oxoid AnareoGen (N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>) rendszerrel anaerobizált dobozokban 14 napig, 28°C-on fényen inkubáltam.

**A konjugáláshoz használt oldatok, táptalajok:**

***Thiocapsa* sóoldat:** 1 literre: 20g NaCl, 1g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1g MgCl<sub>2</sub>, 1g KCl

**Konjugációs táptalaj:** 1 literre: 18g NaCl, 1g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1g MgCl<sub>2</sub>, 1g KCl, 1g NH<sub>4</sub>Cl, 2g NaHCO<sub>3</sub>, 2g Na-acetát, 2g Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 2g Nutrient Broth, 1.5% Agar, 20 $\mu$ l B<sub>12</sub> (1000 $\mu$ g/ml), 1ml mikroelem oldat (lásd: 5.2.2.), 1ml 20 mM Fe-EDTA

**PCA lemez:** 1 literre: 18g NaCl, 1g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1g MgCl<sub>2</sub>, 1g KCl, 1g NH<sub>4</sub>Cl, 2g NaHCO<sub>3</sub>, 2g Na-acetát, 2g Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 0,5g Na<sub>2</sub>S, 7g Phyta gél, 20 $\mu$ l B<sub>12</sub> (1000  $\mu$ g/ml), 1ml mikroelem oldat (lásd: 5.2.2.), 1ml 20mM Fe-EDTA

#### 5.4.12. KONJUGÁLÁS *R. EUTROPHA*-BA

---

A *R. eutropha*-t a konjugációhoz 30°C-on 2 napig, a megfelelő vektort tartalmazó *E. coli* S17-1  $\lambda$ pir sejteket 37°C-on a megfelelő antibiotikum jelenlétében OD<sub>600</sub>=0,6-ig növesztettem,

majd centrifugálás után, sóoldatban felvéve összekevertem. Az így kapott sejteket FNC táptalajra cseppentettem. Csak a donor, és csak a recipiens törzseket tartalmazó kontroll kísérleteket is elvégeztem. Egy napon át 30°C-on inkubáltam ezeket a lemezeket. Másnap, hígítási sort készítve szelektív, FN lemezre szélesztettem a mindkét baktériumot tartalmazó, valamint a két kontroll lemezről is. A lemezeket további 2 napig, 30°C-on inkubáltam.

#### **A konjugáláshoz használt oldatok, táptalajok:**

**Ralstonia sóoldat:** 40mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,02% MgSO<sub>4</sub>, 0,001% CaCl<sub>2</sub>, 0,0005% FeCl<sub>3</sub>

**FNC táptalaj:** 40mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.02% MgSO<sub>4</sub>, 0.2% NH<sub>4</sub>Cl, 0.001% CaCl<sub>2</sub>, 0.0005% FeCl<sub>3</sub>, 0.2% fruktóz, 15g/l agar, 2g/l Nutrient broth

**FN lemez:** 15g/l agarral kiegészített FGN tápoldat (lásd: 5.2.3.)

---

#### 5.4.13. POLIMERÁZ LÁNCREAKCIÓ

---

A reakciókat leggyakrabban Hybaid PCRExpress típusú készülékben végeztem. Az alábbi koncentrációjú reagensekből a végtérfogat 1/10 részét adtam a reakcióhoz: primerek: 10pmol/μl; dNTP: 2mM; 10× DyNAzyme puffer (Finnzymes). Templátként (2μl) 50× hígított vektor DNS-t, illetve *E. coli* sejteken végzett kolónia PCR esetén 2μl sejtuszpenziót (1 kolóniát 20μl vízben felfuszpendáltam) használtam. 0,5μl DyNAzyme (Finnzymes) enzimet adtam 20μl reakcióelegybe.

Azokban az esetekben, amikor szükség volt olyan DNS polimerázra, amely megbízhatóbb átírási pontossággal rendelkezik, Pfu (Fermentas) vagy Phusion (Finnzymes) enzimeket használtam. Általában 30-35 ciklusból állt egy program. Egy tipikus programciklus során a denaturáció 1 percig tartott 95°C-on, a primer-templát hibridizációja 50-55°C-on történt szintén 1 percig, majd ezt követően az elongáció 72°C hőmérsékleten a sokszorozni kívánt DNS hosszának megfelelő ideig tartott. A reakciót 5 percig tartó 72°C-os termosztálással fejeztem be. Phusion polimeráz használatakor a program a következőképpen módosult: denaturáció: 30 másodperc 98°C, hibridizáció: 30 másodperc 50-70°C, 20-30 másodperc/kb polimerizáció 72°C-on. Ezen lépéseket általában 30× ismételtam, majd a záróciklus 1 × 5 perc 72°C-on történt.

#### 5.4.14. NUKLEOTIDSORREND MEGHATÁROZÁSA

---

A DNS szekvencia meghatározások automata szekvenálással készültek specifikus oligonukleotidok felhasználásával.

#### 5.4.15. HELYSPECIFIKUS *hupK* DELÉCIÓS MUTÁNS KÉSZÍTÉSE

---

A leolvasási keretet nem sértő deléciós mutagenézishez a pDHuk (Maróti 2003) plazmidot használtam, melyet először *E. coli* S17-1  $\lambda$  pir törzsbe transzformáltam, majd *T. roseopersicina* GB1131 törzsbe konjugáltam. Az egyszeres rekombináns telepekre kanamicinnel szelektáltam, majd a kiválasztott kolóniákat nem-szelektív tápoldatban növesztettem fel. A másodlagos rekombinánsokra 3% szukróz tartalmú PCA lemezeken szelektáltam. A szukróz rezisztens, de kanamicinre érzékeny kolóniák genotípusát PCR-rel és szekvenálással ellenőriztem.

#### 5.4.16. PONTMUTÁNSOK KÉSZÍTÉSE

---

A mutagenizálandó fragmentet pBluescriptSK+ vektorba építettem, majd a Stratagene QuikChange XL kitet használtam a mutáns klónok létrehozásához. Az 50 $\mu$ l végtérfogatú reakcióelegy a következő komponenseket tartalmazta: 20ng templát DNS, 200 $\mu$ M dNTP-t, 10 $\times$  PfuUltra puffert, valamint a megfelelő mutációt hordozó primer párok tagjaiból 125–125ng-ot. Az amplifikációt 2,5U PfuUltra HF DNS polimerázzal végeztem, a következő program alapján: 30 másodperc 95°C-os kezdeti denaturációt követően a 30 másodperc 95°C, 1 perc 55°C, 6 perc 72°C lépéseket 16-szor ismételtetem meg. A templát plazmidokat a reakcióelegyekhez adott 10U/ $\mu$ l *DpnI* enzimmal emésztettem 1 órán át 37°C-on, ezt követően *E. coli* XL1-Blue MRF' törzsbe transzformáltam. A kész konstrukciókat szekvenálással ellenőriztem.



A mutáció eredményeként megjelenő aminosavakat kódoló tripletek félkövér betűtípussal vannak jelölve.

A mutagenézishez használt oligonukleotidok	
Név	Szekvencia (5'→3')
<i>oC54Af</i>	GCTGCTTTTCTCGATC <b>GCCG</b> CCCGCGCCCAAGCCG
<i>oC54Ar</i>	CGGCTTGGGCGCGGGC <b>GCG</b> GATCGAGCAAAGCAGC
<i>oC378Af</i>	GGCGATCGATCCC <b>GCCG</b> TGGCCTTCAAGC
<i>oC378Ar</i>	GCTTGAAGGCCAC <b>GCG</b> GGGATCGATCGCC
<i>oF51Cf</i>	CCGCTCGTCTGCCGCTGCTTT <b>GCT</b> CGATCTGTGCC
<i>oF51Cr</i>	GGGCACAGATCGAG <b>GCAA</b> AGCAGCGGCAGACGAGCGG
<i>oF381Cf</i>	CGATCCCTGCGTGGCCT <b>GCA</b> AGCTCACCTGTAAAAGC
<i>oF381Cr</i>	GCTTTTACAGGTGAGCTT <b>GC</b> AGGCCACGCAGGGATCG
<i>oF51CC54Af</i>	GCTGCTTT <b>GCT</b> CGATC <b>GCCG</b> CCCGCGCCCAAGCCG
<i>oF51CC54Ar</i>	CGGCTTGGGCGCGGGC <b>GCG</b> GATCGAG <b>GCAA</b> AGCAGC
<i>oC378AF381Cf</i>	CGATCCC <b>GCCG</b> TGGCCT <b>GCA</b> AGCTCACCTGTAAAAGC
<i>oC378AF381Cr</i>	GCTTTTACAGGTGAGCTT <b>GC</b> AGGCCAC <b>GCG</b> GGGATCG

## 5.5. MEMBRÁN ÉS SZOLUBILIS SEJTFRAKCIÓK IZOLÁLÁSA

### 5.5.1. SEJTEK FELTÁRÁSA SZONIKÁLÁSSAL

A 60ml, Hypo-Vial üvegekben felnőtt sejteket 7000rpm-en centrifugáltam, 4°C-on, 10 percig, ezt követően 1ml 20mM kálium-foszfát pufferben (pH=7,00) szuszpendáltam fel az üledéket. A sejteket szonikálással tártam fel (Bandelin Sonopuls (Berlin, Germany) HD3100 ultrasonic homogenizer; 85%-os amplitúdó, 6 szonikálási ciklus, 1 ciklus időtartama: 15 másodperc). A szonikálás utáni szuszpenziót 7000 rpm-en centrifugáltam 4°C-on, 10 percig. Az

Eppendorf cső alján összegyűlt „csapadékot”, amely a fel nem tárt sejteket és a sejtekből kiszabaduló kénkristályokat tartalmazza, elválasztottam a felülúszótól és mint “sejtkivonat” dolgoztam vele tovább.

### 5.5.2. MEMBRÁN- ÉS SZOLUBILIS FRAKCIÓ ELVÁLASZTÁSA ULTRACENTRIFUGÁVAL

---

A sejttörmeléktől elválasztott sejtkivonat Sorvall WX Ultra Series 90 típusú ultracentrifugával (paraméterek: T-1270 típusú rotor; 38 000rpm, 4°C, 1,5 óra) centrifugáltam. A kialakult felülúszó frakció eltávolítása után a kiülepedett membrán frakciót 1ml 20mM kálium-foszfát pufferben (pH = 7,00) szuszpendáltam fel.

## 5.6. FEHÉRJEMUNKÁK

---

### 5.6.1. DENATURÁLÓ POLIAKRILAMID GÉLELEKTROFORÉZIS (SDS-PAGE)

---

A fehérjeminták analíziséhez 1,5mm vastag 12%-os denaturáló poliakrilamid gélt használtam, amely egy szeparáló, és egy felső, tömörítő gélből állt. A mintákat 4xSDS-felvívő pufferben 10 percig 95°C-on inkubáltam, a futtatás TGS (TRIS-glicin-EDTA) pufferben történt 120V-on, 2 órán keresztül. A géleket futtatás után Western hibridizációs kísérletben használtam tovább.

**A denaturáló gélelektroforézishez használt oldatok, gélek összetétele:**

**Szeparáló gél:** 4,9ml H<sub>2</sub>O, 6ml 30% akrilamid (akrilamid-biszakrilamid: 29:1), 3,8ml 1,5M-os TRIS puffer (pH = 8,80), 0,15ml 10% SDS, 0,15ml 10% APS és 6μl TEMED

**Tömörítő gél:** 0,5ml 30% akrilamid, 380μl 1,5M TRIS (pH = 6,80), 30μl 10% SDS, 30μl 10% APS, 3μl TEMED és végül desztillált vízzel 3ml-re egészítettem ki az elegyet

**TGS puffer:** 25mM TRIS, 192mM glicin, 0,1% SDS pH = 8,30

**4-szeres felvívő puffer:** 100mM TRIS/HCl (pH = 6,80), 200mM DTT, 4% SDS, 0,2% brómfenolkék, 20% glicerin

### 5.6.2. FEHÉRJE MENNYISÉGI MÉRÉSE LOWRY MÓDSZERREL (MICRO-LOWRY MÓDSZER)

---

A fehérjéket triklórecetsavval (TCA-val) való kicsapás után 800µl 0,25M NaOH-ban oldottam fel, majd a C reagensből 300µl-t adtam a fehérje oldathoz és keverés után 15 percig szobahőn tartottam. Ezután 100µl 72%-os Folin reagenst adtam hozzá. 30 perc inkubálás után 750nm-en mértem az oldat fényelnyelést fotométerrel (BIORAD SmartSpec 3000).

Az ismeretlen minták koncentrációját borjú szérum albuminból készített kalibrációs egyenes alapján állapítottam meg (Yeang 1998).

#### **A micro-Lowry módszerhez használt oldat:**

**C reagens:** 6%-os nátrium-karbonát és 15%-os réz-szulfát, 3% nátrium-citrát keverék 50:1 arányú elegye

### 5.6.3. WESTERN HIBRIDIZÁCIÓ

---

A kísérletekhez sejtextraktumokat (Lásd: 5.5.1.) használtam, melyek összfehérje tartalmának meghatározása a fentiekben részletezett módon történt (Lásd: 5.5.3.). A Western hibridizációs kísérletekben 100µg-nyi összfehérjét tartalmazó mintákat használtam. Az egyes mintákban lévő fehérjéket 12% SDS-PAGE-sel választottam el (Lásd: 5.6.1.), majd nitrocellulóz membránra (Amersham™ Hybond™-ECL) blottoltam Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad) készülék segítségével (15 perc, 25mV; Lonza ProSieve EX transfer buffer). A membránt ezután 1 órán át blokkoló oldatban tartottam, ezzel megakadályozva a nem-specifikus fehérjék kötődését. *StrepTagII* elleni ellenanyagot használtam 1:10 000 hígításban, PBST pufferben. A detektálás során a membránt 1 percig inkubáltam az "enhancer" és peroxid 1-1ml-es elegyével (Pierce, SuperSignal West Pico Rabbit IgG Detection Kit), majd a kemilumineszcens jelet autoradiográfiásan detektáltam (GE Healthcare Limited, Amersham Hyperfilm ECC).

#### **A Wesern hibridizációhoz használt oldatok:**

**PBST puffer:** 118mM NaCl, 4mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 16mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,1% Tween 20, pH = 7,40

**Blokkoló oldat:** 5%-os alacsony zsírtartalmú tejpor feloldva PBST pufferben

## 5.7. ANALITIKAI MÓDSZEREK

---

### 5.7.1. *IN VIVO* HIDROGÉNTERMELÉS-MÉRÉS

---

A baktérium törzseket 60ml, 5 $\mu$ M NiCl<sub>2</sub> tartalmú PC tápoldatban vagy nitrogénfixáló NC tápoldatban (lásd 5.2.2.), 125ml-es Hypo-Vial üvegekbe oltottam le, nitrogén gázzal anaerobizáltam a lezárt üvegeket, majd fényen való növesztést követően a gáztérből 200 $\mu$ l mintát vettem ki Hamilton fecskendővel és gázkromatográfba fecskendeztem. A baktérium törzseket tartalmazó üvegek légtéréből vett minták hidrogén tartalmát hővezetőképességi detektorral mértem (Agilent 6890, MoSieve 5 kolonna, TCD detektor).

### 5.7.2. *IN VITRO* HIDROGÉNFELEVŐ AKTIVITÁSMÉRÉS

---

Az enzimek hidrogénfelvevő aktivitás-változásának vizsgálatához a *T. roseopersicina* sejt kultúrákat anaerob körülmények között, megemelt nikkel, és a Hup hidrogenáz esetében lecsökkentett (a standard 4g/l helyett 2g/l) tioszulfát tartalmú, Pfennig-féle tápoldatban növesztettem (Maroti 2010). 1mg összfehérjét tartalmazó sejt kivonaton végeztem a méréseket, mesterséges elektronakceptor (benzil-viologén) jelenlétében. A spektrofotometriás vizsgálatokhoz használt küvetákban az egyes törzsekből származó sejt kivonatot megfelelő mennyiségét (ami 1mg összfehérjét tartalmazott) 20mM kálium-foszfát pufferrel (pH = 7,00) egészítettem ki 2ml-re, majd 40 $\mu$ l 40mM benzil-viologén oldatot adtam a reakcióelegyhez. A küveták lezárása után a mintákat 5 percig nitrogén gázzal, majd újabb 5 percig 100% hidrogén gázzal öblítettem, majd a spektrofotométerben 60°C-on inkubáltam. A hidrogenáz enzim aktivitása miatt a benzil-viologén redukálódik és a reakcióelegy kék színűvé változik, melyet így a használt redox festék elnyelési hullámhosszán 600nm-en lehetett nyomon követni. Az abszorbancia idő szerinti deriváltja megadja, hogy adott idő alatt mennyi benzil-viologént tudott elredukálni a rendszer, ez pedig arányos a hidrogén oxidáció kinetikájával (Bagyinka 1982).

A *R. eutropha* törzs hidrogenázának *in vitro* aktivitásmérése annyiban különbözött az előzőtől, hogy mesterséges elektronakceptorként metilénkéket használtam. A reakcióelegyhez 40 $\mu$ l 70mM redox festéket adtam, mely oxidált állapotban kék színű és redukciója során

elszínítenedik. A reakciót 37°C-on mértem, a festéknek megfelelő 570nm elnyelési hullámhosszon.

---

### 5.7.3. *IN VITRO* NITROGENÁZ AKTIVITÁSMÉRÉS

---

A nitrogenáz aktivitásmérésekhez acetilén redukciós módszert (Stewart 1967) használtam. A méréseket NC tápoldatban növesztett sejt kultúrákon végeztem. A 60ml sejtet tartalmazó Hypo-Vial üvegeket (125ml) argonnal anaerobizáltam, majd a kultúrák légterébe acetilén (a gáz fázis kb. 13%-a) gázt jutattam. Fényen történő inkubációt (4 óra) követően, a Hypo-Vial üvegek gázteréből 100 $\mu$ l gázt fecskendeztem a gázkromatográfba. Az acetilén és etilén különválasztását és mennyiségi analizését Shimadzu GC-2010 típusú gázkromatográfon végeztem (HP-PlotQ, TCD detektor).

---

### 5.7.4. TIOSZULFÁT TARTALOM MEGHATÁROZÁSA

---

A kultúrából kivett 1ml mintát 22 500xg-n 15 percig centrifugáltam, ezután a felülúszót, desztillált vízzel százszorosára hígítottam. Az így kapott oldatnak mértem a tioszulfát koncentrációját BioRad SmartSpec Plus spektrofotométeren, 230nm hullámhosszon, kvarc küvetében. Kalibrációs sorozatot készítettem, és 4-16mM tioszulfát tartalmú hígítási sor alapján számoltam a tápoldatban a visszamaradt tioszulfát mennyiségét (Maróti 2010b).

---

### 5.7.5. SZERVESSAV-TARTALOM MEGHATÁROZÁS

---

A fermentáció során a tápoldatban maradt szerves savak mennyiségének meghatározását Hitachi La-Chrom Elite folyadék kromatográf segítségével végeztem. A célkomponensek elválasztása ICsep ICE-COREGEL 64H kolonnával (300mm x 7,8mm x 10 $\mu$ m), 0,01N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> mozgó fázissal, 0.8ml/perc áramlási sebesség alkalmazásával történt. A kolonnatér hőmérséklete 50°C-os az RI detektor 41°C-os volt. A kultúrából fecskendővel kivett 500 $\mu$ l mintákat 13 000rpm-en centrifugáltam 10 percig. Az automata mintaadagoló segítségével a felülúszóból 50 $\mu$ l-t injektáltam. A célkomponensek a kromatográfia során alapvonalig elváltak egymástól és a háttérkomponensektől, kivétel a tejsav és a borostyánkősav, de ezek 1 mintában sem szubsztrátként sem termékként nem fordultak elő.

---

# EREDMÉNYEK ÉS KIÉRTÉKELÉSÜK

---

## 6.1. A HupK ÉS A HoxV KISEGÍTŐ FEHÉRJÉK HETEROLÓG EXPRESSZIÓJA

---

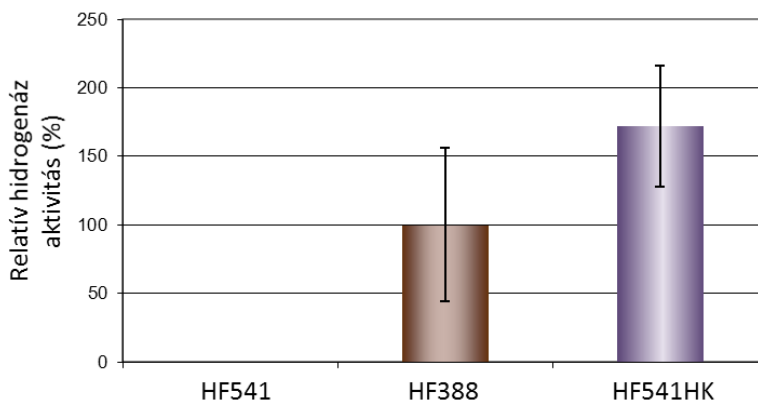
A *T. roseopersicina*-ban lévő HupK és a *R. eutropha*-ban lévő HoxV kisegítő fehérjék szekvenciái hasonlóak, elsődleges szerkezetük 33%-ban megegyező és 44%-ban hasonló aminosavakból épül fel. A HoxV részletes vizsgálata *R. eutropha*-ban kimutatta, hogy közvetítő szerepet játszik a membránkötött hidrogenáz (MBH) aktív centrumának érésében, a  $\text{Fe}(\text{CN})_2\text{CO}$  csoportot juttatja a nagy alegységhez (Ludwig 2009), míg a szolubilis hidrogenáz érésében nincs szerepe. A szakirodalomban számos tanulmányt találunk, melyek a kisegítő fehérjék mutációja okozta specifikus vagy pleiotróp hatásokról számolnak be (Bernhard 1996, Dervedde 1996, Casalot 2001, Blokesch 2002). Azonban hasznos információkat szerezhetünk az aktív [NiFe] hidrogenázok érési folyamatainak specifitásáról, ha a kisegítő fehérjék heterológ expresszióját vizsgáljuk. Heterológ komplementációs kísérletet végeztem, hogy kiderüljön, vajon a HupK és a HoxV funkcionálisan konzerváltak-e annyira, hogy képesek legyenek egymást helyettesíteni a különböző hidrogenázok érési folyamataiban.

### 6.1.1. HETEROLÓG KOMPLEMENTÁCIÓ HupK FEHÉRJÉVEL

---

Annak érdekében, hogy a *T. roseopersicina* HupK fehérje *R. eutropha*-ban kifejeződjön, a *hupK* gént, saját promóterével együtt a pHRP309 expressziós vektorba (Parales 1993) építettem. Az így létrejött pTRK plazmid konstrukciót konjugálással, egy szolubilis hidrogenázra és *hoxV* génre mutáns *R. eutropha* törzsbe, a HF541-be juttattam be. Ezt a törzset HF541HK-nak neveztem el. Mivel a HF541 nem expresszál szolubilis hidrogenázt és nincs érett membránkötött hidrogenáza, ezért ezt a törzset negatív kontrollként használtam. A *R. eutropha* HF388-ból csak a szolubilis hidrogenáz génjei vannak eltávolítva, ezért ennek hidrogenáz aktivitását (ami csak a membránkötött hidrogenázból származik) vettem 100%-nak, pozitív kontrollnak.

Mértem a HF541HK HupK-t expresszáló *R. eutropha in vitro* hidrogénfelvevő hidrogenáz aktivitását, hogy kiderüljön, képes-e együttműködni a sejt saját érési fehérjéivel. Összehasonlítva a HF541HK *in vitro* hidrogenáz aktivitását a pozitív kontrolléval azt tapasztaltam, hogy a *hoxV* mutációt teljesen helyreállította a HupK fehérje (6. ábra).



**6. ábra: A *T. roseopersicina hupK* génnel komplementált *R. eutropha in vitro* hidrogénfelvevő aktivitása**

Az értékek százalékos értékek, a pozitív kontrollhoz viszonyítva.

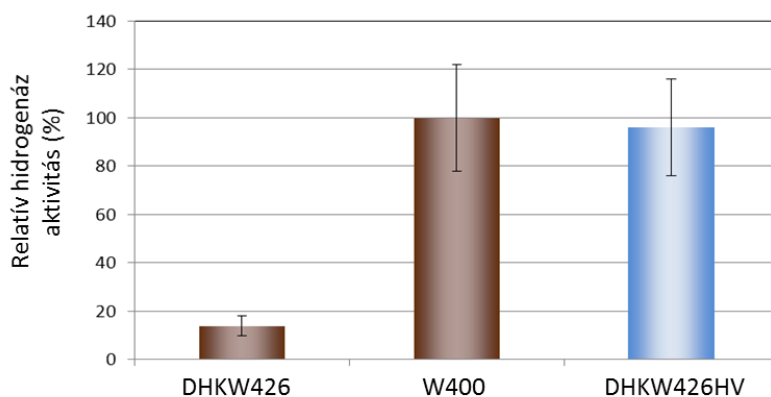
**HF541:** negatív kontroll, szolubilis hidrogenáz és *hoxV* mutáns törzs; **HF388:** pozitív kontroll, szolubilis hidrogenáz mutáns törzs; **HF541HK:** heterológ komplementált minta, szolubilis hidrogenáz és *hoxV* mutáns törzs, *hupK* génnel komplementálva

### 6.1.2. HETEROLÓG KOMPLEMENTÁCIÓ H<sub>oxV</sub> FEHÉRJÉVEL

A HoxV kisegítő fehérje működőképességét is vizsgáltam *T. roseopersicina*-ban. Mivel a *R. eutropha* csak egyféle, Hup-típusú membránkötött hidrogenázzal rendelkezik, felmerült a kérdés, hogy a HoxV mind a Hup, mind a Hyn bioszintézisében részt vesz-e, vagy esetleg szelektív valamelyikre.

A *hupK* mutáció komplementálásához egy olyan plazmid konstrukciót készítettem (pREV), amely pDSK5crt-Km vektoron a *hoxV* gén expresszióját a *T. roseopersicina* karotenoid promótere (*crtD*) szabályozza (Fodor 2004). A karotenoid (*crt*) promóter anaerob körülmények között konstitutívan fejeződik ki, megfelelően erős promóter *T. roseopersicina* sejtekben (Kovács 2003). Ezt a pREV nevű plazmidot kétféle *T. roseopersicina* mutáns törzsbe juttattam be, attól függően, hogy melyik hidrogenáz aktivitását akartam mérni. Mindkét enzim

aktivitásméréséhez benzil-viologént használtam, mesterséges elektronakceptorként. A Hyn hidrogenáz esetében egy *hupK* mutáns törzsbe (DHKW426) konjugáltam be a pREV vektort, létrehozva a DHKW426HV törzset (1. táblázat). Mivel ez a törzs expresszálja mindkét membránkötött hidrogenázt, ezért hővel (80°C) inaktiváltam a hőérzékeny Hup enzimet, majd a membránfrakción szelektíven tudtam mérni a Hyn *in vitro* hidrogén-oxidáló aktivitását. Ebben a kísérletben is a recipiens törzset, a DHKW426-ot használtam negatív kontrollnak. A pozitív kontroll (W400), a DHKW426 komplementálva a *hupK* génnel (pB6HupK), melynek aktivitását 100%-nak vettem. A heterológ módon kifejezett HoxV fehérje képes volt komplementálni a *hupK* mutációt, és helyreállítani a Hyn hidrogenáz *in vitro* aktivitását a DHKW426HV törzsben (7. ábra).



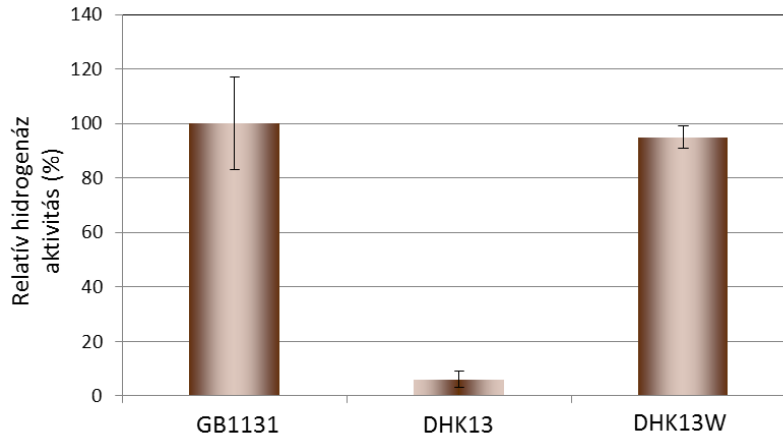
**7. ábra: A *R. eutropha hoxV* génnel komplementált *T. roseopersicina* Hyn hidrogenázának *in vitro* hidrogénfelvevő aktivitása**

Az értékek százalékos értékek, a pozitív kontrollhoz viszonyítva.

**DHKW426:** negatív kontroll, *hupK* mutáns törzs; **W400:** pozitív kontroll, homológ komplementált DHKW426; **DHKW426HV:** heterológ komplementált minta, DHKW426 törzs *hoxV* génnel komplementálva

Ahhoz, hogy a Hup hidrogenáz aktivitását szelektíven tudjam mérni, a *hupK* gént eltávolítottam a Hyn és Hox1 dupla mutáns (GB1131) törzs genomjából, egy leolvasási keret nem sértő deléciós mutagenézissel. Az így létrejött DHK13 törzset használtam negatív kontrollként, mely 6% Hup hidrogenáz aktivitást mutatott a GB1131 ( $\Delta hynSL$ ,  $\Delta hox1H$ ) törzshöz képest (8. ábra). A DHK13 komplementálása a vad típusú HupK fehérjével (DHK13W) teljesen, 95%-ra visszaállította a Hup aktivitását (1. táblázat).



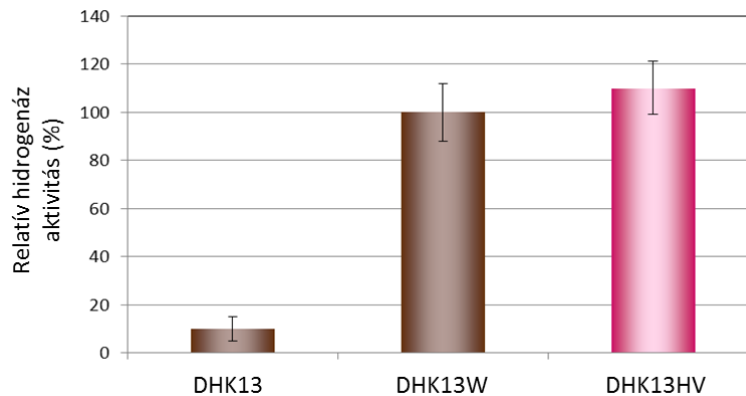


**8. ábra: A Hup hidrogenáz *in vitro* hidrogénfelvevő aktivitása**

Az értékek százalékos értékek, a pozitív kontrollhoz viszonyítva.

**GB1131:** pozitív kontroll; Hyn és Hox1 mutáns törzs; **DHK13:** negatív kontroll; Hyn, Hox1 és *hupK* mutáns törzs; **DHK13W:** DHK13 törzs *hupK*-val komplementálva

A továbbiakban a DHK13W nevű törzset használtam pozitív kontrollként és relatív aktivitását 100%-nak vettem. A DHK13 törzsbe bejuttatva a pREV vektort, létrehoztam a DHK13HV törzset (1. táblázat). Merve az aktivitását, azt kaptam, hogy a Hup hidrogenáz aktivitása a pozitív kontrolléval közel azonos volt (9. ábra).



**9. ábra: A *R. eutropha hoxV* génnel komplementált *T. roseopersicina* Hup hidrogenázának *in vitro* hidrogénfelvevő aktivitása**

Az értékek százalékos értékek, a pozitív kontrollhoz viszonyítva.

**DHK13:** negatív kontroll, Hyn, Hox1 és *hupK* mutáns törzs; **DHK13W:** pozitív kontroll, homológ komplementált DHK13; **DHK13HV:** heterológ komplementált minta, DHK13 törzs *hoxV* génnel komplementálva

A *R. eutropha*-ban a szolubilis hidrogenáz mellett csak egy, Hup-típusú membránkötött hidrogenáz található, melynekérésében a HoxV nélkülözhetetlen szerepet játszik (Bernhard 1996). Azonban az *in vitro* hidrogénfelvevő aktivitások egyértelmű bizonyítékokkal szolgáltak, hogy a *R. eutropha*-ból származó HoxV fehérje részt tud venni nemcsak a Hup, hanem a Hyn hidrogenázérésében is *T. roseopersicina*-ban. Tehát elmondható, hogy a heterológ HoxV pleiotróp kiegészítő elemként működött közre a *T. roseopersicina* membránkötött [NiFe] hidrogenázainakérésében.

**1. Táblázat: A heterológ komplementáció során elkészült vektorok és törzsek**

Törzsek	Genotípus	Referencia
<b><i>Thiocapsa roseopersicina</i></b>		
DHKW426HV	pREV plazmid a DHKW426 törzsben	Ez a munka
DHK13	$\Delta hupK$ , $\Delta hynSL$ , $\Delta hox1H$	Ez a munka
DHK13W	pB6HupK plazmid a DHK13 törzsben	Ez a munka
DHK13HV	pREV plazmid a DHK13 törzsben	Ez a munka
<b><i>Ralstonia eutropha</i></b>		
HF541HK	pTRK a HF541 törzsben	Ez a munka

Vektorok	Genotípus	Referencia
pREV	<i>hoxV</i> gén a pDSK5crt-Km vektorban	Ez a munka
pTRK	<i>hupK</i> gén a pHRP309 vektorban	Ez a munka

## 6.2. A HupK FEHÉRJÉBEN LÉVŐ KONZERVÁLT AMINOSAVAK AZONOSÍTÁSA

A *D. gigas* membránkötött [NiFe] hidrogenáz kristályszerkezetének elemzése kiderítette, hogy négy konzervált cisztein játszik nélkülözhetetlen szerepet a nagy alegység aktív

centrumának koordinálásában (Volbeda 1995). Ezek az aminosavak egy-egy CXXC motívumban helyezkednek el a C- és az N-terminális közelében. A *T. roseopersicina* Hup hidrogenázának, valamint a *R. eutropha* MBH nagy alegységeinek, és a HupK (valamint a vele homológ HoxV fehérje) aminosavsorrendjének összehasonlításakor megfigyeltem, hogy a fent említett négyből csak két cisztein található meg a vizsgált kisegítő fehérjékben. Ez a két cisztein az 54-es és a 378-as pozícióban helyezkedik el. A másik két ciszteint fenil-alanin helyettesíti a HupK 51-es és a 381-es pozícióiban, míg a *R. eutropha* HoxV fehérje 381-nek megfelelő pozíciójában tirozin található (10. ábra).

	51 54	
<i>T. r.</i> HupK	-ASAFVGRSPHETAARLPLL <b>F</b> SI <b>C</b> ARAQAGACAGAFEQASGWVASPIIRGRREAAIAAET 90	
<i>R. e.</i> HoxV	-ERLLRGRPGEAAPHLLPRL <b>F</b> AL <b>C</b> GEAHGVTAALAVNAALGRVAAPE PALFR--RLAHET 86	
<i>T. r.</i> HupL	LEVILRGRDPRDAWAFTERI <b>C</b> GV <b>C</b> TGTHALTSVRAVEDALGIPIPENANSIRNIMHVTLQ 114	
<i>R. e.</i> HoxG	YSIFMKGKDPDRDSHFITSRI <b>C</b> GI <b>C</b> GDNHATCSVYAQNMAVGVKPPPIADWIINLGEAAEY 120	
	378 381	
<i>T. r.</i> HupK	AELL--ITAIDP <b>C</b> V <b>A</b> <b>F</b> KLTCKSAT----- 389	
<i>R. e.</i> HoxV	IGIL--VAAYDP <b>C</b> VP <b>Y</b> TVEFAESLGDVHA----- 383	
<i>T. r.</i> HupL	LEILRTLHSFDP <b>C</b> LA <b>C</b> ATHIMGPDGEELTRIKVR----- 596	
<i>R. e.</i> HoxG	IDIMRAVRSFDP <b>C</b> LP <b>C</b> GVHMYVGNKGTIEQSHSPTFGVMAGAH 603	

### 10. ábra: A konzervált helyzetű aminosavak elhelyezkedése

*T. r.*: *Thiocapsa roseopersicina*; *R. e.*: *Ralstonia eutropha*

**HupL**: Hup hidrogenáz nagy alegysége; **HoxG**: MBH nagy alegysége

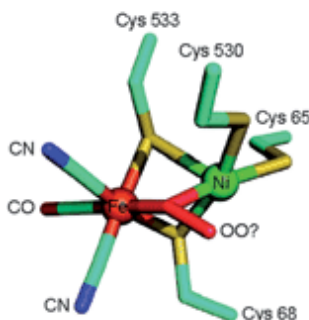
Az illetett szekvenciák felett látható számok a *Tr* HupK-ban található konzervált ciszteinekre és fenil-alaninokra vonatkoznak.

## 6.3. A CISZTEIN-MUTÁNS HupK FEHÉRJÉK HATÁSA A Hup HIDROGENÁZ AKTIVITÁSÁRA

A HupK fehérjében található konzervált aminosavak szerepének vizsgálatát pontmutánsok létrehozásával végeztem. Az irányított mutagenézissel létrehozott aminosav cserék hatását a Hup hidrogenáz aktivitásán keresztül ellenőriztem. A vizsgálat tárgyát képező cisztein egy hidrofíli tulajdonságokkal rendelkező aminosav, amely enzimekben tiol oldallánca révén fém kofaktorok megkötésére képe. Ahhoz, hogy vizsgálni tudjam a cisztein hiányát, egy teljesen más karakterű

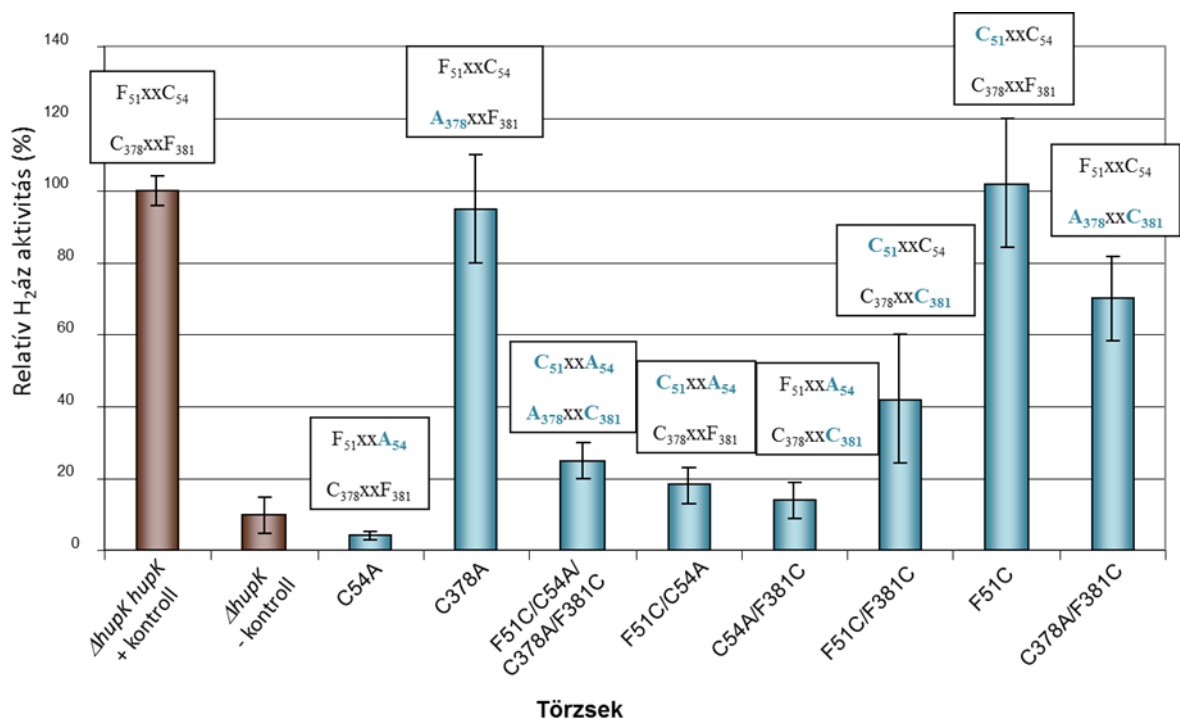
aminosavra kellett lecserélnem. Ezért esett a választás az alaninra, hiszen hidrofób oldallánca nem alkalmas a fémion megkötésére, ezáltal nem tudja betölteni a cisztein szerepét.

Az irányított mutagenézishez kiindulópontként szolgáló vektor a pB6HupK, tartalmazza a *hupK* gént és a promóterét, valamint *T. roseopersicina*-ban és *E. coli*-ban is képes replikálódni. Erről a konstrukcióról kifejeződő enzim egyúttal a vad típusú pozitív kontrollt is jelentette. A mutagenézis eredményeképpen sikerült az 54-es és a 378-as pozícióban levő ciszteineket kódoló tripleteket egyesével alanint meghatározó nukletidokra cserélni. A pontmutációkat hordozó plazmidokat a következőképpen neveztem el: pMC54A és pMC378A, jelezve, hogy a plazmidról kifejeződő HupK kisegítő fehérjében mely pozícióban lévő ciszteinek helyett fog alanin beépülni a fehérje szintézise során (2. táblázat). Ezeket a konstrukciókat a már fentebb jellemzett DHK13 *T. roseopersicina* törzsbe konjugáltam, amely alkalmas arra, hogy szelektíven mérjem a Hup hidrogenáz molekuláris hidrogén-oxidáló aktivitását. A mutációt hordozó HupK fehérjét kifejező *T. roseopersicina* törzseket a következőképpen neveztem el (2. táblázat): C54A és C378A (utalva a megfelelő aminosavcserére).



**11. ábra: A *D. gigas* [NiFe] hidrogenázának aktív centruma (Li 2010)**

A HupK-ban lévő 54-es cisztein a *D. gigas* [NiFe] hidrogenázának a nikkell- és vas- ionhoz is kapcsolódó Cys68-as aminosavának felel meg (11. ábra) (Volbeda 1995). Abban az esetben, ha ezt a Cys54-et alaninra cseréltem (HupK C54A mutáns törzs, 2. táblázat), jelentős mértékű aktivitáscsökkenést tapasztaltam, a Hup hidrogénfelvevő aktivitásának 96%-a elveszett (12. ábra). Ez az eredmény arra enged következtetni, hogy az 54-es ciszteinek döntő jelentőségű szerepe lehet a HupK érésben betöltött működése során.



**12. ábra: A Hup hidrogenáz *in vitro* hidrogénfelvevő aktivitása a HupK mutáns törzsekben**

Az értékek százalékos értékek, a pozitív kontrollhoz viszonyítva.

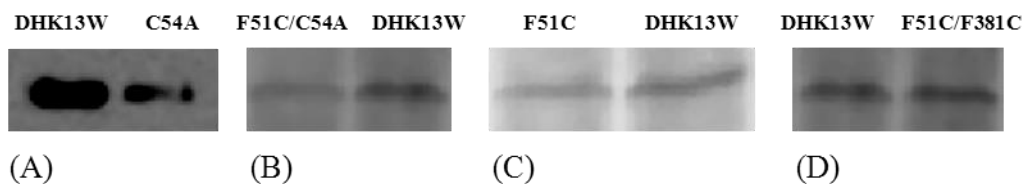
Az oszlopok felett lévő szövegdoxozok a vizsgált aminosavakat jelölik. Az irányított mutagenezissel kicserélt aminosavak vastagabb betűkkel vannak jelölve.

Annak érdekében, hogy igazoljam, hogy a HupK C54A törzsnél tapasztalt aktivitáscsökkenés valóban az aminosavcsere következménye és nem a HupK csökkent proteolitikus stabilitása áll a háttérben, Western-blot kísérleteket végeztem. A rekombináns HupK-*Strep*TagII fúziós fehérje mennyiségét *Strep*TagII elleni poliklonális ellenanyaggal követtem nyomon. A 13.A ábrán látható, hogy a C54A HupK-nak megfelelő fehérjesáv intenzitása nagyjából a fele a pozitív kontrollból származó vad típusú HupK fehérjének. Ebből azt a következtetést vontam le, hogy a HupK C54A mutáns törzs drasztikus aktivitásesése csak részben tulajdonítható a C54A HupK fehérje lecsökkent mennyiségének. Mivel az alanint kódoló kodon kiválasztásánál figyelembe vettem a *T. roseopersicina* kodon preferenciáját, ezért nem valószínű, hogy a transláció korai befejeződése miatt látunk kevesebb fehérjét. Ezért valószínű, hogy az aminosavcserenek köszönhetően a C54A HupK fehérje proteolitikus instabilitása megnőtt, ami szintén hozzájárulhatott a C54A HupK mutáns aktivitás csökkenéséhez. Azaz ebből a kísérleti elrendezésből nem lehet teljesen számszerűsíteni a mutáció HupK aktivitására

vonatkozó hatását, de ez azon a tényen nem változtat, hogy a HupK fehérje 54-es pozíciójában lévő Cys aminosava döntő fontosságú. Mutációja hatással van a HupK fehérjének az érésben betöltött szerepére és magának a HupK fehérjének a stabilitására is.

A hidrogénfelvevő aktivitás nem változott számottevően a HupK C378A törzsben, amelyben a *D. gigas* [NiFe] hidrogenázának Cys530-nak megfelelő ciszteint cseréltem alaninra. A Hup – a DHK13W, pozitív kontrollhoz képest mutatott - 95%-os aktivitása jelzi (12. ábra), hogy a HupK C-terminálisán lévő ciszteinnek nincs jelentősége a Hup hidrogenáz érésében. Ez az eredmény is megerősíti azt a hipotézisemet, hogy a HupK kisegítő fehérje a [NiFe] aktívcentrum kialakításában, a vas beépítésében játszik szerepet. Ugyanis a *D. gigas* [NiFe] hidrogenázának 530-as pozícióban lévő ciszteinje csak a nikkelhez kapcsolódik (11. ábra).

A [NiFe] nagy alegységben lévő további két ciszteint, melyekből egyik csak a nikkelhez, másik mindkét fémionhoz kapcsolódik, a *T. roseopersicina* HupK fehérjében fenil-alaninok helyettesítenek az 51-es és a 381-es pozíciókban. A HupK F51C/C54A/C378A/F381C mutáns törzs (2. táblázat) létrehozásával az volt a célom, hogy kiderítsem, vajon a Cys54 és a Cys378 aminosavak funkcióját a Cys51 és a Cys381 aminosavak át tudják-e venni. A tetra-*hupK* mutáns törzs 28%-os hidrogénfelvevő aktivitása azt jelzi, hogy a Cys51 és a Cys381 nem képes végrehajtani a Cys54 és a Cys378 feladatát a Hup hidrogenáz érésében (12. ábra).



**13. ábra: Az aminosavcserét tartalmazó HupK fehérjék Western-hibridizációs képe**

A DHK13W törzsben kifejeződő vad típusú HupK fehérje szolgált pozitív kontrollként.

Az 54-es cisztein szerepének mélyebb megismerése érdekében további két mutáns törzset készítettem szintén irányított mutagenézissel. Ezekben a mutánsokban a ciszteint az 54-es pozícióból áthelyeztem az 51-es (HupK F51C/C54A) pozícióba és a 381-es fenilalanint ciszteinre cseréltem (HupK C54A/F381C) (2. táblázat). Egyik dupla mutáns törzs aktivitása sem érte el a DHK13W aktivitásának 20%-át (12. ábra). Ezek az eredmények azt

bizonyítják, hogy sem az 51-es, sem a 381-es pozícióban lévő cisztein nem képes komplementálni a Cys54 hiányát. A Western-hibridizációs kísérlet eredményeit összehasonlítva, a 13.A és 12. B ábra alapján elmondható, hogy a C54A és az F51A/C54A mutáns aminosas sorrendű fehérjék és pozitív kontroll fehérje mennyiségének aránya hasonló. Ezek az eredmények azt támasztják alá, hogy a *Tr* F51C/C54A/C378A/F381C törzs aktivitásesését főként a Cys54 hiánya okozza. Az *in vitro* hidrogén felvevő aktivitásmérések egyértelműen azt bizonyítják, hogy a Cys54 szerepe nélkülözhetetlen és pozíciója nem változtatható meg.

**2. Táblázat: A HupK fehérje irányított mutagenézise során elkészült vektorok és *T. roseopersicina* törzsek**

Vektorok	Genotípus	Referencia
pMC54A	C54A pontmutáció a pB6HupK vektorban	Ez a munka
pMC378A	C378A pontmutáció a pB6HupK vektorban	Ez a munka
pMF51C/C54A/C378A/F381C	F51C/C54A/C378A/F381C pontmutációk a pB6HupK vektorban	Ez a munka
pMF51C/C54A	F51C/C54A pontmutációk a pB6HupK vektorban	Ez a munka
pMC54A/F381C	C54A/F381C pontmutációk a pB6HupK vektorban	Ez a munka
pMF51C/F381C	F51C/F381C pontmutációk a pB6HupK vektorban	Ez a munka
pMF51C	F51C pontmutáció a pB6HupK vektorban	Ez a munka
pMC378A/F381C	C378A/F381C pontmutációk a pB6HupK vektorban	Ez a munka

Törzsek	Genotípus	Referencia
C54A	pMC54A plazmid a DHK13 törzsben	Ez a munka
C378A	pMC378A plazmid a DHK13 törzsben	Ez a munka

F51C/C54A/C378A/F381C	pMF51C/C54A/C378A/F381C plazmid a DHK13 törzsben	Ez a munka
F51C/C54A	pMF51C/C54A plazmid a DHK13 törzsben	Ez a munka
C54A/F381C	pMC54A/F381C plazmid a DHK13 törzsben	Ez a munka
F51C/F381C	pMF51C/F381C plazmid a DHK13 törzsben	Ez a munka
F51C	pMF51C plazmid a DHK13 törzsben	Ez a munka
C378A/F381C	pMC378A/F381C plazmid a DHK13 törzsben	Ez a munka

A NiFe hidrogenázok nagy alegységére jellemző, N- és C-terminálison is megtalálható, négyciszteines CXXC motívum felelős az aktív centrum koordinálásáért. A HupK fehérjében, azonban a négyből csak két cisztein helye konzervált, a másik kettőt fenil-alanin helyettesíti. A *Tr* F51C/F381C mutáns törzsben expresszálandó HupK fehérje tartalmazza a nagy alegységre jellemző CXXC/CXXC szekvenciamintázatot (2. táblázat). Ez a törzs a pozitív kontrollhoz képest 42%-os aktivitást mutat (12. ábra). Azonban a *Tr* F51C törzs aktivitása, melyben a *Tr* F51C/F381C törzshöz képest a 381-es pozícióban megmaradt a fenil-alanin, a pozitív kontrolléval volt megegyező. Western-hibridizációval megvizsgálva ezen fehérjék mennyiségét, azt kaptam, hogy a vad típusú HupK-hoz képest az F51C HupK mennyisége egy kicsivel kevesebb volt, míg az F51C/F381C HupK gyakorlatilag megegyezett vele (13.C és D ábra). A kapott eredmények, egyrészt magyarázhatóak azzal, hogy a 381-es helyen lévő fenil-alaninnak kitüntetett szerepe van a HupK működése során, másrészt a HupK fehérjében kialakított négy cisztein túl erősen köti a vasat ahhoz, hogy a  $\text{Fe}(\text{CN})_2\text{CO}$  csoport át tudjon jutni a HupK-ról a Hup hidrogenáz nagy alegységére. Összehasonlítva a *Tr* C378A és a *Tr* C378A/F381C törzsek aktivitását, arra a következtetésre jutottam, hogy a 381-es helyen lévő fenil-alaninnak kitüntetett szerepe van a HupK működése során. Ugyanis a két mutáns közötti különbség csak a 381-es pozícióban lévő aminosavban van, azonban a *Tr* C378A/F381C kb. 25%-kal mutat kisebb aktivitást, mint a *Tr* C378A. Ezt a megállapítást támasztja alá a *Tr* F51C és a *Tr* F51C/F381C mutáns törzsek aktivitása is. Ebben az esetben azonban kb. 60%-os aktivitás különbség volt mérhető, ami magyarázható azzal, hogy a HupK fehérjében kialakított négy cisztein (*Tr* F51C/F381C) valószínűleg túl erősen



köti a vasat ahhoz, hogy a  $\text{Fe}(\text{CN})_2\text{CO}$  csoport át tudjon jutni a HupK-ról a Hup hidrogenáz nagy alegységére.

## 6.4. FOTOFERMENTATÍV HIDROGÉNTERMELÉS SZERVES SZUBSZTRÁTOKBÓL

---

A hidrogenáz enzimeken kívül a nitrogénázok is fontos szerepet játszanak a hidrogéntermelésben. Mivel a *T. roseopersicina* rendelkezik a hidrogén metabolizmus mindkét kulcsenzimével, ezért azon kevés mikroorganizmusok közé tartozik, melyek alkalmasak a két enzim ugyanazon fajon belüli összehasonlítására. Csoportunk korábbi kutatási eredményei bizonyítják, hogy a nitrogénáz jelentős mennyiségű hidrogéntermelésére képes, rövid idő alatt. Ezzel szemben a Hox1 hidrogenáz egy nagyságrenddel kevesebb hidrogént termel naponta, viszont erre akár két héten keresztül is képes. Összességében tehát a két enzim által termelt hidrogén mennyisége összevethető (Kovács 2006).

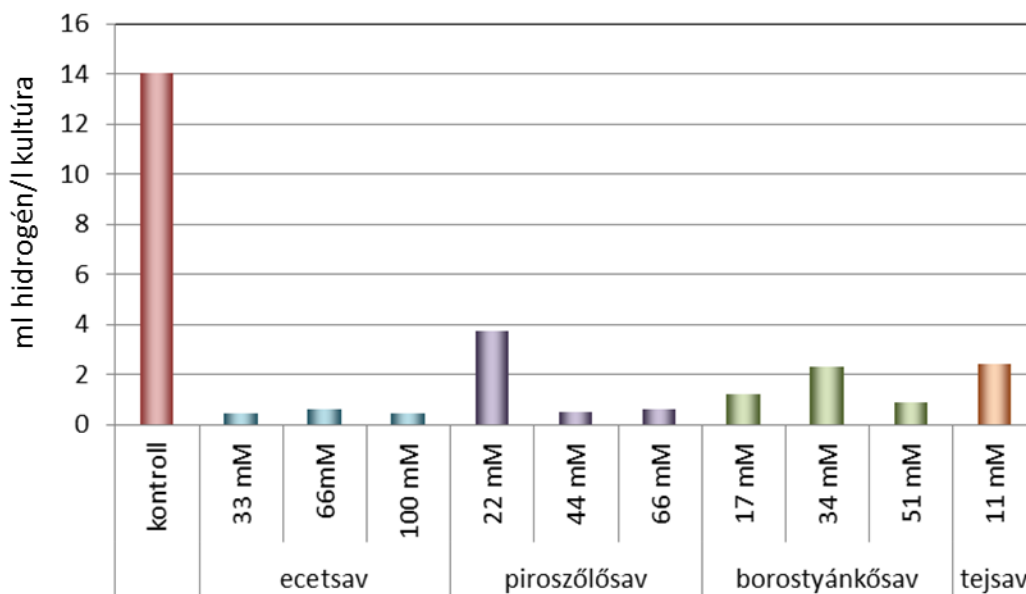
A fotoheterotróf baktériumok a szerves szubsztátok széles skáláját képesek felhasználni szén-, illetve nitrogénforrásként, ezek közül azonban csak kevés alkalmas arra, hogy belőlük hidrogén termelődjön (Koku 2002). A sötét fermentáció leggyakoribb végtermékeit; az ecetsavat, a borostyánkősavat, a piroszőlősavat és a tejsavat választottam ki, hogy megvizsgáljam, a *T. roseopersicina* képes-e metabolizálni ezeket a szubsztátokat. A kísérletekben alkalmazott szerves sav koncentrációkat szakirodalmi adatok és a *T. roseopersicina* tűrőképessége alapján határoztam meg. A *T. roseopersicina* számára a tioszulfát az elsődleges elektrondonor, mind az anaerob fotoszintézishez, mind pedig a hidrogéntermeléshez (Laurinavichene 2007, Rákhely 2007). Arra voltam kíváncsi, hogy az elsődleges elektronforráson kívül a fent említett szerves savakat is tudja-e redukálószerként használni a sejtosztódás és/vagy a hidrogén termelés során. Továbbá, hogy a szerves savak hogyan befolyásolják a két enzim *in vivo* hidrogéntermelését.

Annak érdekében, hogy össze tudjam hasonlítani a szerves savak Hox1 hidrogenázra és nitrogénázra gyakorolt hatását, két *T. roseopersicina* mutáns törzset, az M539-et és a GB1121-et használtam.

#### 6.4.1. SZERVES SAVAK HATÁSA A Hox1 *IN VIVO* HIDROGÉNTERMELÉSÉRE

A Hox1 hidrogenáz hidrogéntermelését a GB1121 *T. roseopersicina* törzs segítségével tudtam nyomonkövetni. Ebben a mutánsban a két membránkötött hidrogenáz struktúrgénjei (*hynSL*, *hupSL*) hiányoznak, míg a második szolubilis hidrogenáz (Hox2), az alkalmazott növesztési körülmények között, nem aktív. Ilyenformán a termelt hidrogén csak a Hox1 működése során keletkezhet.

Az alap, 16mM tioszulfátot tartalmazó PC tápoldaton felnövesztett sejtek *in vivo* hidrogéntermelését tekintetem kontrollnak. Ezt a tápoldatot egészítetem ki különböző mennyiségű ecetsavval (33mM, 66mM, 100mM), piroszőlősavval (22mM, 44mM, 66mM), borostyánkőssavval (17mM, 34mM, 51mM) és tejsavval (11mM). A kilencedik napig megtermelt, egy liter kultúrára vonatkoztatott összhidrogén mennyiségeket tüntettem fel a 14. ábrán.



14. ábra: A Hox1 hidrogenáz által termelt felhalmozódó hidrogén mennyisége, különböző szerves sav koncentrációk mellett

**Kontroll:** szerves sav mentes tápoldaton felnövesztett GB1121 hidrogéntermelése. Az oszlopok a kilencedik napig megtermelt összhidrogén mennyiségeket jelölik, egy liter kultúrára vonatkoztatva.

Az adatokból jól látszik, hogy nemcsak, hogy többlet hidrogén nem keletkezett a szerves savakkal való kiegészítés során, de még a szubsztrát-mentes kontroll által megtermelt hidrogén

mennyiségét sem érték el. Ezek a nagyon alacsony értékek nem magyarázhatóak azzal, hogy a sejtek nem tudtak szaporodni és így a kevesebb biomassza kevesebb hidrogént termelt, egységnyi térfogatra vonatkoztatva. Ugyanis az összfehérje mennyiségeket megmérve, pont ellenkező eredményeket kaptam (az adatok nincsenek feltüntetve). Szerves savak jelenlétében több biomassza keletkezett, mint a kontrollban. Tehát elmondható, hogy a GB1121 *T. roseopersicina* törzs a különböző szerves savakat a fotoheterotróf növekedéshez használja fel, mint szénforrást, nem pedig a hidrogénképzéshez. Azt azonban meg kell jegyezni, hogy a Hox1 egy kétirányba működő hidrogenáz, nemcsak termeli, hanem vissza is veszi a hidrogént. Valószínű, hogy hatékonyabb hidrogéntermelés érhető el, ha a sejt kultúra légtéréből naponta eltávolítjuk a megtermelt hidrogént.

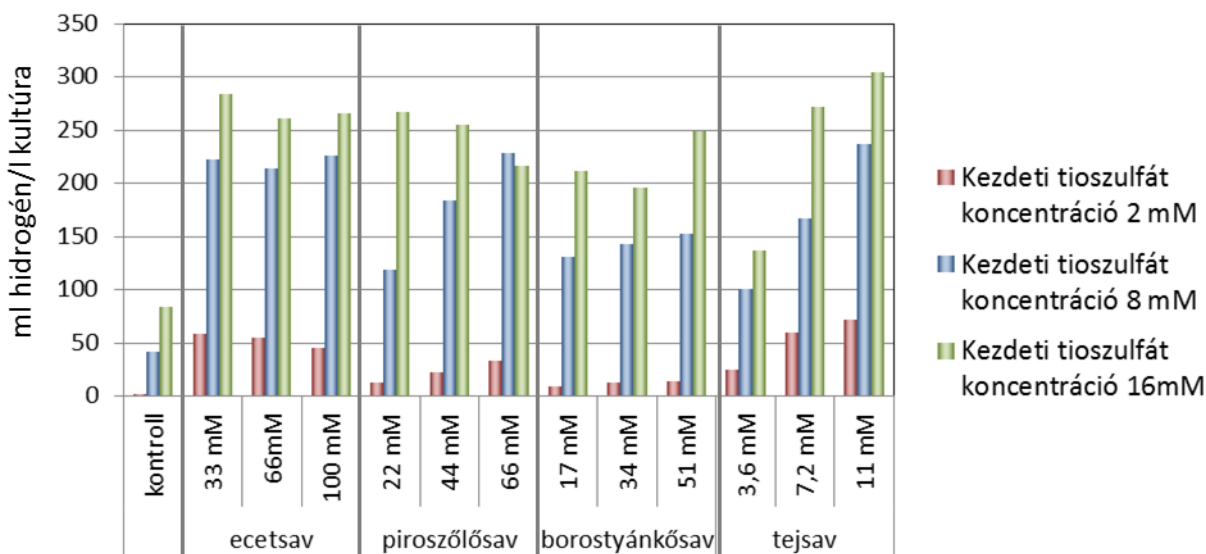
#### 6.4.2. SZERVES SAVAK HATÁSA A NITROGENÁZ *IN VIVO* HIDROGÉNTERMELÉSÉRE

---

A nitrogenáz enzim általi hidrogéntermelést az M539 *T. roseopersicina* törzsben vizsgáltam, melyben a *hypF* gén transzpozonos mutagenézissel el lett roncsolva. A HypF az összes hidrogenáz éréséhez nélkülözhetetlen, pleiotróp hatású kisegítő fehérje, tehát ebben a törzsben egyik hidrogenáz enzim érése sem megy végbe (Fodor 2001). Nitrogénfixáló körülmények között (ammónia nélkül és elemi nitrogén jelenlétében) nevelve ezt a törzset, az *in vivo* keletkező hidrogén csak és kizárólag a nitrogenáztól származik.

A tápoldat kezdeti tioszulfát koncentrációját lecsökkentettem 8 mM-ra, ill. 2 mM-ra és vizsgáltam, hogy a hozzáadott szerves savak, különböző kiindulási koncentrációkban, milyen hatással vannak a nitrogenáz hidrogéntermelésére. Szintén kontrollnak vettem a szerves sav mentes, különböző mennyiségű tioszulfátot (2 mM, 8 mM, 16 mM) tartalmazó NC tápoldaton felnevesztett sejtek *in vivo* hidrogéntermelését. Ezt a tápoldatot egészítettem ki különböző mennyiségű ecetsavval (33 mM, 66 mM, 100 mM), piroszőlősavval (22 mM, 44 mM, 66 mM), borostyánkőssavval (17 mM, 34 mM, 51 mM) és tejsavval (3,6 mM, 7,2 mM, 11 mM). A 15. ábrán látható a kilencedik napig megtermelt, egy liter kultúrára vonatkoztatott összhidrogén mennyiségek.

Kivétel nélkül, mindegyik esetre elmondható, hogy a hozzáadott szerves sav (mindegyik koncentrációban) jelentős mértékben megnövelte a termelt hidrogén mennyiségét a kontrollhoz képest, függetlenül a tioszulfát koncentrációtól.



**15. ábra: A nitrogénáz által termelt felhalmozódó hidrogén mennyisége, különböző tioszulfát és szerves sav koncentrációk mellett**

**Kontroll:** szerves sav mentes tápoldaton felnövesztett M539 hidrogéntermelése. Az oszlopok a kilencedik napig megtermelt összhidrogén mennyiségeket jelölik, egy liter kultúrára vonatkoztatva.

Az ecetsav esetében látható, hogy a viszonylag alacsony, 33mM kezdeti ecetsav koncentráció is elegendő volt ahhoz, hogy jelentős mértékben megnövelje a hidrogéntermelő aktivitást, mindegyik tioszulfát koncentrációnál. A magasabb (66mM és 100mM) ecetsav koncentrációk nem eredményeztek többlet hidrogéntermelést. A tápoldatban visszamaradt ecetsav mennyiségének meghatározása ad magarázatot erre az eredményre. Ugyanis azt kaptam, hogy a *T. roseopersicina* a kilencedik napig csak 33 mM ecetsavat volt képes a tápközegből felvenni, még az ennél magasabb kiindulási ecetsav koncentrációk esetében is. A tizennegyedik napig sem fogyott el a szerves szubsztrát teljes mennyisége.

2mM és 8mM tioszulfát mellett a piroszőlősav koncentrációjának emelésével nőtt a megtermelt hidrogén mennyisége is, ez viszont nem volt megfigyelhető 16mM tioszulfát esetén.

A borostyánkőssavval történt kiegészítés hatására ugyanaz a tendencia figyelhető meg az *in vivo* hidrogéntermelésben, mint az ecetsav esetén. Azonban a megtermelt hidrogén mennyisége egyik esetben sem éri el azt a szintet, amit az ecetsav hozzáadásával kaptam, azonos tioszulfát koncentrációkat tekintve. Meg kell jegyezni, hogy sem a 44mM és 66mM kezdeti piroszőlősav, sem a 34mM és 51mM kezdeti borostyánkőssav teljes mennyisége nem fogyott el, még a növesztés tizennegyedik napjára sem.

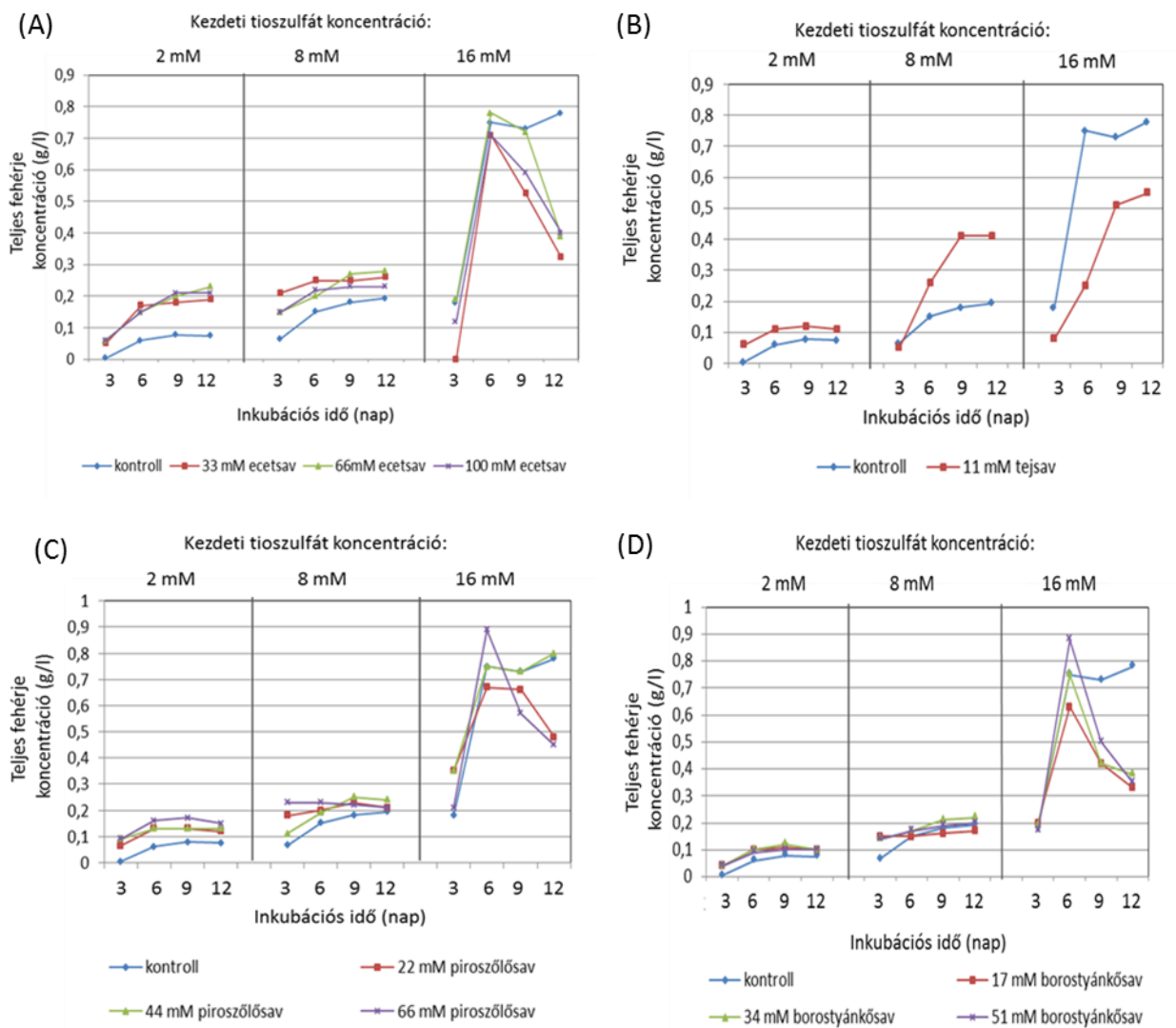
A 15. ábrán az is jól látszik, hogy adott tioszulfát koncentráció mellett, ha emeltem a tejsav kiindulási mennyiségét, akkor azzal párhuzamosan nőtt a megtermelt hidrogén mennyisége is. A szerves savak közül egyedül a tejsav volt az, melyet a sejtek maradéktalanul metabolizáltak, már a kilencedik napra. A szerves savaknak az *in vivo* hidrogéntermelésre gyakorolt hatásait összehasonlítva megállapítható, hogy a legmagasabb tioszulfát (16mM) és tejsav (11mM) koncentrációk mellett mértem a legtöbb hidrogént.

#### 6.4.3. SZERVES SAVAK HATÁSA AZ M539 BIOMASSZA KÉPZÉSÉRE ÉS TIOSZULFÁT FELHASZNÁLÁSÁRA

---

Annak érdekében, hogy kiderítsem, hogy a szerves savakat az M539 törzs a hidrogéntermelés mellett a sejtszaporodásához is fel tudja-e használni, a kísérletek során a kultúrák sejtszám változását a teljes fehérje mennyiségének meghatározásával követtem nyomon. Azért volt szükség erre a módszerre, mert a sejtekben felhalmozódó kén globulusok befolyásolják a sejtek fényelnyelését, így az általánosan elterjedt optikai denzitás mérése nem alkalmas a biomasza növekedés vizsgálatára.

A leoltástól számított 3., 6., 9. és 12. napon vett minták, egy liter kultúrára vonatkoztatott teljes fehérje mennyiségét ábrázolja a 16. ábra. Általánosságban elmondható, hogy alacsonyabb kiindulási tioszulfát koncentrációk mellett (2mM vagy 8mM), a sejtszám egyik esetben sem érte el a 16mM kezdeti tioszulfát koncentrációjú minta értékét. Még abban az esetben sem, ha alternatív elektronforrásként nagy mennyiségű szerves sav állt a sejtek rendelkezésére.



**16. ábra: A szerves savak hatása az M539 kultúra összfehérje mennyiségére, különböző tioszulfát koncentrációk mellett**

**A:** ecetsav, **B:** tejsav, **C:** piroszőlősav, **D:** borostyánkősav.

**Kontroll:** szerves sav mentes tápoldaton felnövesztett M539 teljes fehérje mennyisége.

Az inkubációs idő nulladik napján történt a leoltás.

Az is megállapítható, hogy az ecetsavat (16.A ábra), a piroszőlősavat (16.C ábra), és a tejsavat (16.B ábra) 2mM és 8mM tioszulfáton volt képes a *T. roseopersicina* a fotoheterotróf növekedéséhez felhasználni. Az alacsonyabb tioszulfát mennyiségeknél a borostyánkősav (16.D ábra) nem befolyásolta a biomasza képzést, de belőle számottevő mennyiségű hidrogén keletkezett 8mM tioszulfát mellett (15. ábra). A tejsav viszont gátolta a fotoheterotróf növekedést 16mM tioszulfát jelenlétében.

Összehasonlítva a 15. és a 16. ábrák adatait elmondható, hogy alacsonyabb tioszulfát koncentrációnál (2 és 8mM) a kontrollhoz képest kevesebb sejt, a kontrollhoz képest több hidrogént termelt. Azonban magasabb tioszulfát koncentrációnál (16 mM) a kontrollhoz képest több sejt, a kontrollhoz képest több hidrogént termelt

Fontos megjegyezni, hogy egyedül a 16mM tioszulfát és 11 mM tejsav jelenlétében volt jelentős mértékben alacsonyabb a kultúra fehérjetartalma, mint a szerves sav mentes kontrollé (16.B ábra). Ennek ellenére, az egy liter kultúrára vonatkoztatott hidrogéntermelése kb. a négyszerese volt a kontrollénak (15. ábra).

A tioszulfát, mint elsődleges elektronforrás tápoldatból való fogyásának nyomonkövetése is hasznos információkkal szolgálhat. Azt akartam megvizsgálni, hogy a szerves savak befolyásolják-e a tioszulfát felhasználásának sebességét. Azt az eredményt kaptam, hogy sem az ecetsav, sem a borostyánkősav nem volt hatással a tioszulfát fogyására. Koncentrációjuktól függetlenül, a tioszulfát kb. 75%-át felhasználták a sejtek a harmadik napig, és a kilencedik napig a teljes mennyisége elfogyott. Azonban ettől eltérő tendenciát mutat az elsődleges elektrondonor felhasználásának kinetikája piroszőlősav jelenlétében. Ugyanis a piroszőlősav befolyásolta a tioszulfát fogyás sebességét, ha növeltem annak kezdeti koncentrációját, akkor lassult a tioszulfát felhasználás, azonban meglepő módon nem fogyott el a teljes mennyisége a tápoldatból a kilencedik napra sem. Hasonlóan, a tejsav jelenléte is befolyásolta a tioszulfát felhasználás kinetikáját, mindegyik kezdeti tioszulfát koncentrációnál. Amennyiben a szerves szubsztrát jelen volt, a tioszulfátot lassabban vették fel a sejtek, de a kilencedik napra maradéktalanul elfogyott. A kapott eredmények alapján elképzelhető, hogy a szervesetlen redukált kén és a tejsav, illetve a piroszőlősav felhasználásának metabolikus útvonalai között kapcsolat van.

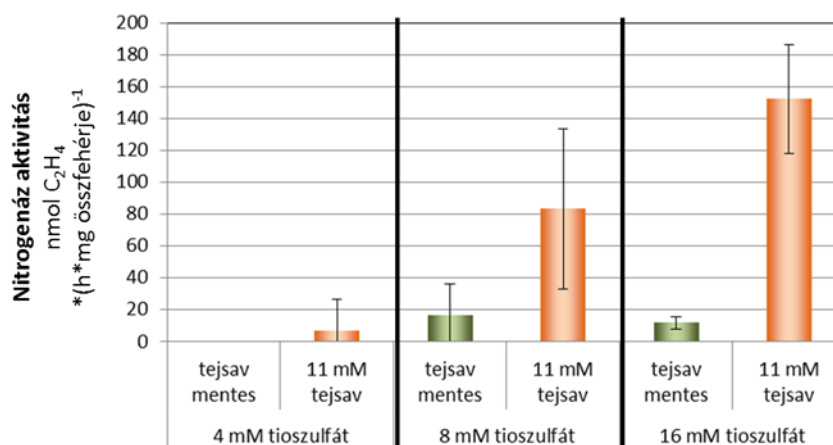
#### 6.4.4. A TEJSAV HATÁSA A NITROGENÁZ *IN VITRO* AKTIVITÁSÁRA ÉS EXPRESSZIÓJÁRA

---

A szerves savaknak a nitrogenáz *in vivo* hidrogéntermelésére gyakorolt hatása alapján a laktát tűnt a leghatékonyabbnak. A *T. roseopersicina* egy liter kultúrára vonatkoztatott hidrogéntermelése 16mM tioszulfát és 11mM tejsav mellett volt a legmagasabb (15. ábra).

Továbbá a tejsav teljes mennyiségét metabolizálták a sejtek, ami szintén nagyon fontos szempont, hiszen az ipari alkalmazásban nemcsak a hidrogéntermelés a lényeg, hanem a sötétfermentációs végtermékek és az ipari melléktermékek minél hatékonyabb hasznosítása.

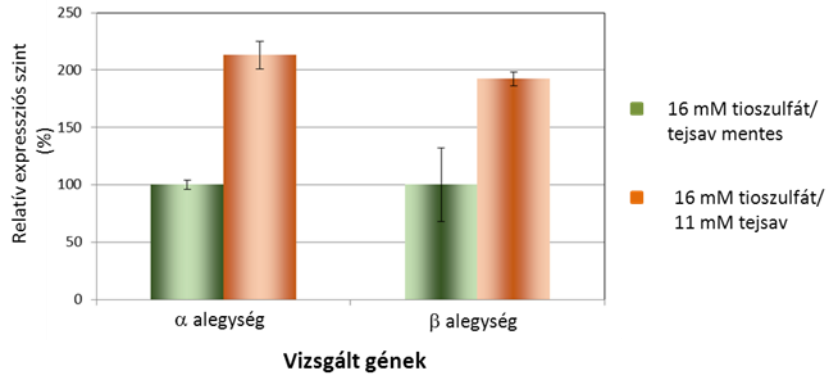
A nitrogenáz enzim *in vivo* hidrogéntermelése mellett az *in vitro* aktivitását is megvizsgáltam, acetilén redukciós módszer segítségével. A mérés során a gáztérbe juttatott acetilént ( $C_2H_2$ ) a nitrogenáz enzim etilénné ( $C_2H_4$ ) redukálja. Az egy óra alatt keletkező és 1mg teljes fehérjemennyiségre vonatkoztatott etilén mennyisége határozza meg az enzim aktivitását (17. ábra). Összehasonlítva a tejsavat nem tartalmazó és a 11mM tejsavval kiegészített minták nitrogenáz aktivitását, ugyanazt a tendenciát figyelhetjük meg, mint az *in vivo* hidrogéntermelő aktivitásnál. Tejsav jelenlétében többszörösére emelkedik a nitrogenáz acetilénredukáló aktivitása is, tioszulfát koncentrációtól függetlenül.



**17. ábra: A nitrogenáz enzim *in vitro* acetilén redukáló aktivitása, különböző tioszulfát és tejsav koncentrációk mellett**

A tejsavnak, a nitrogenáz  $\alpha$  és  $\beta$  alegységének kifejeződésére gyakorolt hatását is megvizsgáltam (18. ábra). Mivel 16mM tioszulfát jelenlétében volt a legnagyobb különbség, mind *in vivo*, mind *in vitro* a tejsav mentes és a tejsavval kiegészített minták között, ezért a továbbiakban csak ezt a két mintát vizsgáltam. A kvantitatív RT-PCR eredményei azt jelzik, hogy mindkét alegység expressziója a kétszeresére nőtt a tejsav hatására.





**18. ábra: A nitrogénáz  $\alpha$  és  $\beta$  alegységének relatív mRNS szintjei, 16 mM tioszulfát jelenlétében, tejsav hiányában vagy jelenlétében**

Az aktivitás mérések (15. és 17. ábra) és az expressziós vizsgálatok (18. ábra) eredményei összhangban vannak egymással és azt igazolják, hogy a *T. roseopersicina* képes a tejsavat metabolizálni és hatására a nitrogénáz enzimszisztémájával jelentős mennyiségű hidrogént termelni. Valamint a sejtek a tejsavat elsősorban hidrogéntermelésre használják fel, mivel a szerves sav mentes kontrollhoz képest kevesebb biomasszát képez.

Összességében tehát elmondható, hogy az M539 *T. roseopersicina* törzs alkalmas lehet a sötétfermentációban keletkező tejsav további hasznosítására, és nitrogénáza által, figyelemre méltó mennyiségű hidrogén termelésére.

---

# ÖSSZEFOGLALÁS

---

A *T. roseopersicina* több szempontból is alkalmas modellorganizmusnak a biohidrogén termelés kutatásához. Nemcsak azért, mert nitrogénáza és [NiFe] hidrogenázai által képes hidrogént termelni, hanem fotoheterotróf növekedése során szerves sav melléktermékeket is tud metabolizálni.

A [NiFe] hidrogenázok bonyolult metalloenzimek, melyeknek komplex struktúrája sejten belül spontán módon nem tud kialakulni, hanem számos kisegítő fehérje összehangolt működésére van szükség. A hidrogenáz enzimek érésének kutatása során több kisegítő fehérjét sikerült azonosítanunk *T. roseopersicina*-ban, melyeknek ismerete feltétlenül szükséges az enzimek struktúra-funkció vizsgálatához. Az egyik ilyen kisegítő fehérje a HupK, melynek funkciójáról keveset tudunk, azonban homológjáról, a HoxV fehérjéről *R. eutropha*-ban bebizonyították, hogy a membránkött hidrogenáz aktív centrumának összeszerelésében játszik fontos szerepet, a  $\text{Fe}(\text{CN})_2\text{CO}$  csoportot juttatja a nagy alegységhez. A *hupK/hoxV* gének kifejeztetése más organizmusban hasznos információkkal segítheti az érés folyamatának tanulmányozását, megértését.

- A *R. eutropha* *hoxV* mutáns törzsét komplementáltam a *T. roseopersicina*-ból származó *hupK* génnel és mértem a membránkött hidrogenáz *in vitro* aktivitását. Ezzel a kísérlettel bizonyítottam, hogy a HupK fehérje funkcionálisan konzervált annyira, hogy képes együttműködni a *R. eutropha* kisegítő fehérjéivel a hidrogenáz érése során.
- Heterológ gazdában, a *hupK* mutáns *T. roseopersicina* törzsben sikeresen expresszáltam a HoxV fehérjét. A két membránkött hidrogenáz *in vitro* aktivitása alapján elmondható, hogy a HoxV, mind a Hyn, mind a Hup hidrogenáz érésében részt tudott venni.

A HupK fehérje szekvenciáját összehasonlítottam a HoxV és a *T. roseopersicina* Hup hidrogenázának nagy alegységének szekvenciájával. Két olyan motívum is található, melyekben lévő négy cisztein mindegyik membránkött hidrogenáz nagy alegységben megtalálható, és bizonyítottan az aktív centrum koordinálásában van szerepük. Viszont a HupK és a HoxV fehérjékben csak kettőnek a helye konzervált (Cys54 és Cys378 a HupK-ban), melyeknek

szerepe feltételezhetően a vasion megkötése. A másik két ciszteint fenil-alanin helyettesíti (Phe51 és Phe381) a HupK-ban. Azért, hogy részletesebb ismereteket szerezzünk a konzervált aminosavak molekuláris szerepéről, egy módszeres irányított mutagenézis tanulmányt végeztem.

- A HupK fehérjében található konzervált aminosavakat pontmutációval sikeresen kicseréltem egy más karakterű aminosavra, majd a Hup hidrogenáz *in vitro* hidrogénfelvevő aktivitásán keresztül megvizsgáltam, hogy ezeknek az aminosavaknak milyen hatása van a Hup érésére.
- Bizonyítottam, hogy a Cys54 jelentős szereppel bír a HupK fehérje megfelelő működésében, mivel alaninra való cseréje (*Tr* C54A) drasztikusan, 4%-ra lecsökkentette a Hup hidrogenáz aktivitását. Western hibridizációs módszerrel kiderítettem, hogy a C54A HupK kifejeződik, a pontmutáció csak kis mértékben befolyásolta a mutáns fehérjék proteolitikus stabilitását, tisztáztam, hogy a tapasztalt aktivitásbeli különbség nem magyarázható kizárólag a C54A HupK elégtelen expressziójával.
- További pontmutánsok (*Tr* F51C/C54A és *Tr* C54A/F381C) vizsgálatával igazoltam, hogy sem az 51-es, sem pedig a 381-es pozícióba beépített cisztein nem volt képes helyettesíteni a Cys54 szerepét.
- A *Tr* C378A mutáns törzs csekély hidrogenáz-aktivitás csökkenéséből megállapítottam, hogy a 378-as ciszteinnek nincs jelentős szerepe a HupK működésében.
- Összehasonlítva a *Tr* C378A és a *Tr* C378A/F381C, valamint a *Tr* F51C és a *Tr* F51C/F381C mutáns törzsek aktivitását, arra a következtetésre jutottam, hogy a 381-es helyen lévő fenil-alaninnak kitüntetett szerepe van a HupK működése során. Valamint a HupK fehérjében kialakított négy cisztein (*Tr* F51C/F381C) valószínűleg túl erősen köti a vasat ahhoz, hogy a  $\text{Fe}(\text{CN})_2\text{CO}$  csoport át tudjon jutni a HupK-ról a Hup hidrogenáz nagy alegységére.

A fotoszintetikus baktériumok egy egészen változatos csoportja képes a szerves savakat szén- és energiaforrásként metabolizálni. Egy kétlépcsős hidrogéntermelési rendszerben ezek a mikroorganizmusok tovább hasznosíthatják a sötétfermentáció szerves sav melléktermékeit. Munkám célja az volt, hogy kiderítsem, a *T. roseopersicina* alkalmas-e erre a feladatra és, hogy

összehasonlítsam a Hox1 és a nitrogenáz hidrogéntermelését négyféle potenciális szubsztrátból, az ecetsavból, a piroszőlősavból, a borostyánkősavból és a tejsavból.

- *In vivo* hidrogenáz-aktivitásméréssel bebizonyítottam, hogy a *T. roseopersicina* nem képes a Hox1 hidrogenáz enzimével hidrogént termelni az általam vizsgált egyik szerves savból sem.
- Összehasonlítva a szerves savak nitrogenáz enzimre gyakorolt hatását arra a következtetésre jutottam, hogy kivétel nélkül, mindegyik szubsztrát jelentős mértékben megnövelte a termelt hidrogén mennyiségét a szerves sav mentes kontrollhoz képest, függetlenül a tioszulfát koncentrációtól.
- A szubsztrát hasznosítási eredmények alapján megállapítható, hogy az ecetsavat, a piroszőlősavat, és a tejsavat 2mM és 8mM tioszulfát mellett volt képes a *T. roseopersicina* a fotoheterotróf növekedéséhez felhasználni. Ezeknél a tioszulfát mennyiségeknél a borostyánkősav nem befolyásolta a biomassza képzést.
- A dolgozatban vizsgált szerves savak közül a tejsav hatására termelődött a legtöbb hidrogén. A nitrogenáz aktivitás mérései alapján megállapítható, hogy a tejsav, mind az *in vivo* hidrogéntermelő, mind az *in vitro* acetilén redukáló aktivitását igen jelentős mértékben megnövelte.
- A nitrogenáz alegységeinek expressziós vizsgálatával bebizonyítottam, hogy a tejsav fokozza azok kifejeződését.

---

## SUMMARY

---

*T. roseopersicina* is suitable as a model organism in many different ways for biohydrogen research. Not only because it is able to produce hydrogen using its nitrogenase and [NiFe] hydrogenases but it can metabolize organic acid by-products during its photoheterotrophic growth, as well.

[NiFe] hydrogenases are large metalloenzyme complexes unable to form spontaneously. Concerted interactions of numerous auxiliary proteins are needed for this process. Several accessory proteins, essential components in structure-function studies of these complexes, are identified as a result of research on hydrogenase maturation in *T. roseopersicina*. HupK is among these proteins but little is known of it, however it is proven that its homologue, HoxV in *R. eutropha* plays a pivotal role in active centre assembly of membrane-bound hydrogenase. It carries Fe(CN)<sub>2</sub>CO group to large subunit. Forced expression of *hupK/hoxV* genes in other organisms may help us study and understand better the maturation process.

- *hoxV* mutant strain of *R. eutropha* was complemented with the wild type *hupK* derived from *T. roseopersicina* and *in vitro* activity of the membrane-bound hydrogenase was measured. It was shown that HupK protein is functionally conserved enough to cooperate with the accessory proteins of *R. eutropha* during the maturation of hydrogenase complex.

- HoxV protein was expressed successfully in the *hupK* mutant *T. roseopersicina* host. From the *in vitro* activities of Hup and Hyn hydrogenases, it can be concluded that the HoxV could help the maturation of both hydrogenases.

I compared the sequence of the HupK protein to the sequences of HoxV and large subunit of Hup hydrogenase of *T. roseopersicina*. Two motives can be found in which four cysteines are highly conserved in large subunit of all membrane bound hydrogenases and form a coordination sphere surrounding the [NiFe] centre. However, HupK and HoxV harbour two of these four conserved cysteine residues (Cys54 and Cys378 in HupK), which presumably bind

iron. The other two cysteines are substituted by phenylalanines (Phe51 és Phe381) in HupK. In order to gain more insight into the molecular function of conserved amino acid residues, a systematic site-directed point mutagenesis were performed.

- Conserved motives of HupK were replaced to amino acids with completely different properties by site-directed point mutagenesis. Subsequently, effects of amino acid changes on maturation of Hup were monitored via the Hup hydrogenase *in vitro* hydrogen uptake activity.

- I proved that Cys54 of HupK has a fundamental function since its replacement by alanine (*Tr* C54A) led to a dramatic reduction of Hup hydrogenase activity (to 4%). I confirmed the expression of C54A HupK with Western-blotting and hybridization. It is shown that the point mutation slightly influenced the proteolytic stability of the mutant protein. Consequently, this clarified that the activity change of the mutant strain could not be derived from the increased proteolysis or insufficient expression of C54A HupK.

- I proved that the function of Cys54 cannot be substituted by either Cys51 or Cys381 through the investigation of further point mutant strains (*Tr* F51C/C54A és *Tr* C54A/F381C).

- Slight hydrogenase activity reduction of *Tr* C378A indicates that Cys378 of HupK is not an indispensable residue for the proper function of HupK.

- Activity comparison of *Tr* C378A with *Tr* C378A/F381C, and *Tr* F51C with *Tr* F51C/F381C led to the conclusion that Phe381 of HupK is essential. Furthermore, four cysteins in *Tr* F51C/F381C might bind iron so firmly that it might interfere with the transfer of the  $\text{Fe}(\text{CN})_2\text{CO}$  moiety from HupK to HupL.

A diverse group of photosynthetic bacteria can utilise organic acids as carbon and energy sources. In a two-step hydrogen production system these bacteria can further utilise organic acids generated from dark fermentation. The aim of my work was to show whether *T. roseopersicina* is suitable for that role and compare the hydrogen production of Hox1 and nitrogenase from different potential substrates (acetate, pyruvate, succinate and lactate).

- I demonstrated that *T. roseopersicina* is unable to produce hydrogen by Hox1 hydrogenase enzyme from the examined organic acids.

- Based on the comparison of the effect of organic acids on nitrogenase I concluded that each substrate significantly increased the amount of produced hydrogen, irrespectively of thiosulfate concentration.
- Substrate consumption data suggests that *T. roseopersicina* can utilise acetate, pyruvate and lactate for heterotrophic growth in the presence of 2 and 8mM thiosulfate. At these thiosulfate concentrations the succinate did not influence the biomass accumulation.
- Among the examined organic acids, the highest hydrogen production was achieved from lactate. Nitrogenase activity measurements revealed that lactate increased both *in vivo* hydrogen production and *in vitro* ethyne reduction activity of nitrogenase.
- I also proved that lactate enhanced the expression of  $\alpha$  and  $\beta$  subunits of nitrogenase.

---

# HIVATKOZÁSOK JEGYZÉKE

---

- Adams, M.W. (1990). The structure and mechanism of iron-hydrogenases. *Biochim. Biophys. Acta* 1020, 115–145.
- Adams, M.W., Mortenson, L.E., and Chen, J.S. (1980). Hydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta* 594, 105–176.
- Appel, J., and Schulz, R. (1996). Sequence analysis of an operon of a NAD(P)-reducing nickel hydrogenase from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 gives additional evidence for direct coupling of the enzyme to NAD(P)H-dehydrogenase (complex I). *Biochim. Biophys. Acta* 1298, 141–147.
- Armstrong, F.A., Belsey, N.A., Cracknell, J.A., Goldet, G., Parkin, A., Reisner, E., Vincent, K.A., and Wait, A.F. (2009). Dynamic electrochemical investigations of hydrogen oxidation and production by enzymes and implications for future technology. *Chem. Soc. Rev.* 38, 36–51.
- Bagyinka, C., Kovács, K.L., and Rak, E. (1982). Localization of hydrogenase in *Thiocapsa roseopersicina* photosynthetic membrane. *Biochem. J.* 202, 255–258.
- Benchimol, M. (2009). Hydrogenosomes under microscopy. *Tissue Cell* 41, 151–168.
- Bernhard, M., Schwartz, E., Rietdorf, J., and Friedrich, B. (1996). The *Alcaligenes eutrophus* membrane-bound hydrogenase gene locus encodes functions involved in maturation and electron transport coupling. *J. Bacteriol.* 178, 4522–4529.
- Black, L.K., Fu, C., and Maier, R.J. (1994). Sequences and characterization of *hupU* and *hupV* genes of *Bradyrhizobium japonicum* encoding a possible nickel-sensing complex involved in hydrogenase expression. *J. Bacteriol.* 176, 7102–7106.
- Blokesch, M., and Böck, A. (2002). Maturation of [NiFe]-hydrogenases in *Escherichia coli*: the HypC cycle. *J. Mol. Biol.* 324, 287–296.
- Blokesch, M., Albracht, S.P.J., Matzanke, B.F., Drapal, N.M., Jacobi, A., and Böck, A. (2004). The complex between hydrogenase-maturation proteins HypC and HypD is an intermediate in the supply of cyanide to the active site iron of [NiFe]-hydrogenases. *J. Mol. Biol.* 344, 155–167.
- Böck, A., King, P.W., Blokesch, M., and Posewitz, M.C. (2006). Maturation of hydrogenases. *Adv. Microb. Physiol.* 51, 1–71.
- Bogorov, L.V. (1974). [The properties of *Thiocapsa roseopersicina*, strain BBS, isolated from an estuary of the White Sea]. *Mikrobiologiya* 43, 326–332.
- Böhm, R., Sauter, M., and Böck, A. (1990). Nucleotide sequence and expression of an operon in *Escherichia coli* coding for formate hydrogenlyase components. *Mol. Microbiol.* 4, 231–243.



- Bui, E.T., and Johnson, P.J. (1996). Identification and characterization of [Fe]-hydrogenases in the hydrogenosome of *Trichomonas vaginalis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 76, 305–310.
- Burgess, B.K., and Lowe, D.J. (1996). Mechanism of Molybdenum Nitrogenase. *Chem. Rev.* 96, 2983–3012.
- Bürstel, I., Siebert, E., Winter, G., Hummel, P., Zebger, I., Friedrich, B., and Lenz, O. (2012). A universal scaffold for synthesis of the Fe(CN)<sub>2</sub>(CO) moiety of [NiFe] hydrogenase. *J. Biol. Chem.* 287, 38845–38853.
- Cammack, R., Frey, M., and Robson, R. (2001). *Hydrogen as a fuel*. (London and New York: Taylor & Francis Inc.).
- Casalot, L., and Rousset, M. (2001). Maturation of the [NiFe] hydrogenases. *Trends Microbiol.* 9, 228–237.
- Chisnell, J.R., Premakumar, R., and Bishop, P.E. (1988). Purification of a second alternative nitrogenase from a nifHDK deletion strain of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* 170, 27–33.
- Colbeau, A., Kovacs, K.L., Chabert, J., and Vignais, P.M. (1994). Cloning and sequence of the structural (hupSLC) and accessory (hupDHI) genes for hydrogenase biosynthesis in *Thiocapsa roseopersicina*. *Gene* 140, 25–31.
- Das, D., and Veziroglu, T.N. (2008). Advances in biological hydrogen production processes. *Int. J. Hydrog. Energy* 33, 6046–6057.
- Dernedde, J., Eitinger, T., Patenge, N., and Friedrich, B. (1996). hyp gene products in *Alcaligenes eutrophus* are part of a hydrogenase-maturation system. *Eur. J. Biochem. FEBS* 235, 351–358.
- Dischert, W., Vignais, P.M., and Colbeau, A. (1999). The synthesis of *Rhodobacter capsulatus* HupSL hydrogenase is regulated by the two-component HupT/HupR system. *Mol. Microbiol.* 34, 995–1006.
- Elsen, S., Colbeau, A., Chabert, J., and Vignais, P.M. (1996). The hupTUV operon is involved in negative control of hydrogenase synthesis in *Rhodobacter capsulatus*. *J. Bacteriol.* 178, 5174–5181.
- Fodor, B., Rákhely, G., Kovács AT, and Kovács, K.L. (2001). Transposon mutagenesis in purple sulfur photosynthetic bacteria: identification of hypF, encoding a protein capable of processing [NiFe] hydrogenases in alpha, beta, and gamma subdivisions of the proteobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2476–2483.
- Fodor, B.D., Kovács, A.T., Csáki, R., Hunyadi-Gulyás, E., Klement, E., Maróti, G., Mészáros, L.S., Medzihradsky, 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.

- Foglia, D., Ljunggren, M., Wukovits, W., Friedl, A., Zacchi, G., Urbaniec, K., and Markowski, M. (2010). Integration studies on a two-stage fermentation process for the production of biohydrogen. *J. Clean. Prod.* *18, Supplement 1*, S72-S80.
- Fontecilla-Camps, J.C., Frey, M., Garcin, E., Hatchikian, C., Montet, Y., Piras, C., Vernède, X., and Volbeda, A. (1997). Hydrogenase: a hydrogen-metabolizing enzyme. What do the crystal structures tell us about its mode of action? *Biochimie* *79*, 661-666.
- Forzi, L., and Sawers, R.G. (2007). Maturation of [NiFe]-hydrogenases in *Escherichia coli*. *Biometals Int. J. Role Met. Ions Biol. Biochem. Med.* *20*, 565-578.
- Fox, J.D., Kerby, R.L., Roberts, G.P., and Ludden, P.W. (1996a). Characterization of the CO-induced, CO-tolerant hydrogenase from *Rhodospirillum rubrum* and the gene encoding the large subunit of the enzyme. *J. Bacteriol.* *178*, 1515-1524.
- Fox, J.D., He, Y., Shelver, D., Roberts, G.P., and Ludden, P.W. (1996b). Characterization of the region encoding the CO-induced hydrogenase of *Rhodospirillum rubrum*. *J. Bacteriol.* *178*, 6200-6208.
- Friedrich, B., and Schwartz, E. (1993). Molecular biology of hydrogen utilization in aerobic chemolithotrophs. *Annu. Rev. Microbiol.* *47*, 351-383.
- Fritsch, J., Lenz, O., and Friedrich, B. (2013). Structure, function and biosynthesis of O<sub>2</sub>-tolerant hydrogenases. *Nat. Rev. Microbiol.* *11*, 106-114.
- Fu, C., Olson, J.W., and Maier, R.J. (1995). HypB protein of *Bradyrhizobium japonicum* is a metal-binding GTPase capable of binding 18 divalent nickel ions per dimer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 2333-2337.
- Georgiadis, M.M., Komiya, H., Chakrabarti, P., Woo, D., Kornuc, J.J., and Rees, D.C. (1992). Crystallographic structure of the nitrogenase iron protein from *Azotobacter vinelandii*. *Science* *257*, 1653-1659.
- Ghirardi, M.L., Posewitz, M.C., Maness, P.-C., Dubini, A., Yu, J., and Seibert, M. (2007). Hydrogenases and hydrogen photoproduction in oxygenic photosynthetic organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* *58*, 71-91.
- Gogotov, I.N., Zorin, N.A., and Kondrat'eva, E.N. (1976). [Purification and properties of hydrogenase from phototrophic bacterium *Thiocapsa roseopersicina*]. *Biokhimiia Mosc. Russ.* *41*, 836-842.
- Graf, E.-G., and Thauer, R.K. (1981). Hydrogenase from methanobacterium thermoautotrophicum, a nickel-containing enzyme. *FEBS Lett.* *136*, 165-169.
- Happe, R.P., Roseboom, W., Pierik, A.J., Albracht, S.P., and Bagley, K.A. (1997). Biological activation of hydrogen. *Nature* *385*, 126.

- Happe, T., Schütz, K., and Böhme, H. (2000). Transcriptional and mutational analysis of the uptake hydrogenase of the filamentous cyanobacterium *Anabaena variabilis* ATCC 29413. *J. Bacteriol.* *182*, 1624–1631.
- Happe, T., Hemschemeier, A., Winkler, M., and Kaminski, A. (2002). Hydrogenases in green algae: do they save the algae's life and solve our energy problems? *Trends Plant Sci.* *7*, 246–250.
- Hartmann, G.C., Klein, A.R., Linder, M., and Thauer, R.K. (1996). Purification, properties and primary structure of H<sub>2</sub>-forming N<sub>5</sub>, N<sub>10</sub>-methylene tetrahydromethanopterin dehydrogenase from *Methanococcus thermolithotrophicus*. *Arch. Microbiol.* *165*, 187–193.
- Herrero, M., de Lorenzo, V., and Timmis, K.N. (1990). Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* *172*, 6557–6567.
- Hoffman, B.M., Lukoyanov, D., Yang, Z.-Y., Dean, D.R., and Seefeldt, L.C. (2014). Mechanism of nitrogen fixation by nitrogenase: the next stage. *Chem. Rev.* *114*, 4041–4062.
- Howard, J.B., and Rees, D.C. (1996). Structural Basis of Biological Nitrogen Fixation. *Chem. Rev.* *96*, 2965–2982.
- Imperial, J., Rey, L., Palacios, J.M., and Ruiz-Argüeso, T. (1993). HupK, a hydrogenase-ancillary protein from *Rhizobium leguminosarum*, shares structural motifs with the large subunit of NiFe hydrogenases and could be a scaffolding protein for hydrogenase metal cofactor assembly. *Mol. Microbiol.* *9*, 1305–1306.
- Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* *96*, 23–28.
- Jang, Y.-S., Malaviya, A., and Lee, S.Y. (2013). Acetone-butanol-ethanol production with high productivity using *Clostridium acetobutylicum* BKM19. *Biotechnol. Bioeng.* *110*, 1646–1653.
- Jia, H.-P., and Quadrelli, E.A. (2014). Mechanistic aspects of dinitrogen cleavage and hydrogenation to produce ammonia in catalysis and organometallic chemistry: relevance of metal hydride bonds and dihydrogen. *Chem. Soc. Rev.* *43*, 547–564.
- Joerger, R.D., and Bishop, P.E. (1988). Bacterial alternative nitrogen fixation systems. *Crit. Rev. Microbiol.* *16*, 1–14.
- Jones, B.L., and Monty, K.J. (1979). Glutamine as a feedback inhibitor of the *Rhodospseudomonas sphaeroides* nitrogenase system. *J. Bacteriol.* *139*, 1007–1013.
- Kim, D.-H., and Kim, M.-S. (2011). Hydrogenases for biological hydrogen production. *Bioresour. Technol.* *102*, 8423–8431.
- Koku, H., Eroğlu, İ., Gündüz, U., Yücel, M., and Türker, L. (2002). Aspects of the metabolism of hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides*. *Int. J. Hydrog. Energy* *27*, 1315–1329.

- Kondratieva, E.N., Zhukov, V.G., Ivanovsky, R.N., Petushkova, U.P., and Monosov, E.Z. (1976). The capacity of phototrophic sulfur bacterium *Thiocapsa roseopersicina* for chemosynthesis. *Arch. Microbiol.* 108, 287–292.
- Kovacs, K.L., Bagyinka, C., and Tigyí, G. (1988). Proteolytic resistance and its utilization in purification of hydrogenase from *Thiocapsa roseopersicina*. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 935, 166–172.
- Kovács, K.L., and Bagyinka, C. (1990). Structural properties, functional states and physiological roles of hydrogenase in photosynthetic bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 87, 407–411.
- Kovács, A.T., Rákhely, G., and Kovács, K.L. (2003). Genes involved in the biosynthesis of photosynthetic pigments in the purple sulfur photosynthetic bacterium *Thiocapsa roseopersicina*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 3093–3102.
- Kovács, A.T., Rákhely, G., Balogh, J., Maróti, G., Cournac, L., Carrier, P., Mészáros, L.S., Peltier, G., and Kovács, K.L. (2005a). Hydrogen independent expression of hupSL genes in *Thiocapsa roseopersicina* BBS. *FEBS J.* 272, 4807–4816.
- Kovács, A.T., Rákhely, G., Balogh, J., Maróti, G., Fülöp, A., and Kovács, K.L. (2005b). Anaerobic regulation of hydrogenase transcription in different bacteria. *Biochem. Soc. Trans.* 33, 36–38.
- Kovács, K.L., Kovács, A.T., Maróti, G., Mészáros, L.S., Balogh, J., Latinovics, D., Fülöp, A., Dávid, R., Dorogházi, E., and Rákhely, G. (2005c). The hydrogenases of *Thiocapsa roseopersicina*. *Biochem. Soc. Trans.* 33, 61–63.
- Kovács, K.L., Maróti, G., and Rákhely, G. (2006). A novel approach for biohydrogen production. *Int. J. Hydrog. Energy* 31, 1460–1468.
- Laurinavichene, T.V., Rákhely, G., Kovács, K.L., and Tsygankov, A.A. (2007). The effect of sulfur compounds on H<sub>2</sub> evolution/consumption reactions, mediated by various hydrogenases, in the purple sulfur bacterium, *Thiocapsa roseopersicina*. *Arch. Microbiol.* 188, 403–410.
- Leach, M.R., and Zamble, D.B. (2007). Metallocenter assembly of the hydrogenase enzymes. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 11, 159–165.
- Lenz, O., Strack, A., Tran-Betcke, A., and Friedrich, B. (1997). A hydrogen-sensing system in transcriptional regulation of hydrogenase gene expression in *Alcaligenes* species. *J. Bacteriol.* 179, 1655–1663.
- Lenz, O., Bernhard, M., Buhrke, T., Schwartz, E., and Friedrich, B. (2002). The hydrogen-sensing apparatus in *Ralstonia eutropha*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 4, 255–262.
- Levin, D.B., Pitt, L., and Love, M. (2004). Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. *Int. J. Hydrog. Energy* 29, 173–185.
- Ljunggren, M., and Zacchi, G. (2010). Techno-economic analysis of a two-step biological process producing hydrogen and methane. *Bioresour. Technol.* 101, 7780–7788.

- Lowe, D.J., and Thorneley, R.N. (1984). The mechanism of *Klebsiella pneumoniae* nitrogenase action. Pre-steady-state kinetics of H<sub>2</sub> formation. *Biochem. J.* 224, 877–886.
- Ludwig, M., Schubert, T., Zebger, I., Wisitruangsakul, N., Saggu, M., Strack, A., Lenz, O., Hildebrandt, P., and Friedrich, B. (2009). Concerted action of two novel auxiliary proteins in assembly of the active site in a membrane-bound [NiFe] hydrogenase. *J. Biol. Chem.* 284, 2159–2168.
- Ma, K., Weiss, R., and Adams, M.W. (2000). Characterization of hydrogenase II from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* and assessment of its role in sulfur reduction. *J. Bacteriol.* 182, 1864–1871.
- Magalon, A., and Bock, A. (2000). Analysis of the HypC-hycE complex, a key intermediate in the assembly of the metal center of the *Escherichia coli* hydrogenase 3. *J. Biol. Chem.* 275, 21114–21120.
- Maier, T., and Böck, A. (1996). Generation of active [NiFe] hydrogenase in vitro from a nickel-free precursor form. *Biochemistry (Mosc.)* 35, 10089–10093.
- Maróti, G., Fodor, B.D., Rákhely, G., Kovács, A.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. FEBS* 270, 2218–2227.
- Maróti, G., Rákhely, G., Maróti, J., Dorogházi, E., Klement, E., Medzihradszky, K.F., and Kovács, K.L. (2010a). Specificity and selectivity of HypC chaperonins and endopeptidases in the molecular assembly machinery of [NiFe] hydrogenases of *Thiocapsa roseopersicina*. *Int. J. Hydrog. Energy* 35, 3358–3370.
- Maróti, J., Farkas, A., Nagy, I.K., Maróti, G., Kondorosi, E., Rákhely, G., and Kovács, K.L. (2010b). A second soluble Hox-type NiFe enzyme completes the hydrogenase set in *Thiocapsa roseopersicina* BBS. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 5113–5123.
- McKinlay, J.B., and Harwood, C.S. (2010). Photobiological production of hydrogen gas as a biofuel. *Curr. Opin. Biotechnol.* 21, 244–251.
- Modarresi, A., Wukovits, W., Foglia, D., and Friedl, A. (2010). Effect of process integration on the exergy balance of a two-stage process for fermentative hydrogen production. *J. Clean. Prod.* 18, Supplement 1, S63–S71.
- Newton, W.E. (2000). Nitrogen Fixation. In *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, (John Wiley & Sons, Inc.).
- Nicolet, Y., Piras, C., Legrand, P., Hatchikian, C.E., and Fontecilla-Camps, J.C. (1999). *Desulfovibrio desulfuricans* iron hydrogenase: the structure shows unusual coordination to an active site Fe binuclear center. *Struct. Lond. Engl.* 1993 7, 13–23.
- Oh, Y.-K., Raj, S.M., Jung, G.Y., and Park, S. (2011). Current status of the metabolic engineering of microorganisms for biohydrogen production. *Bioresour. Technol.* 102, 8357–8367.

- Oncel, S., and Vardar-Sukan, F. (2009). Photo-bioproduction of hydrogen by *Chlamydomonas reinhardtii* using a semi-continuous process regime. *Int. J. Hydrog. Energy* 34, 7592–7602.
- Page-Sharp, M., Behm, C.A., and Smith, G.D. (1996). *Trichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis*: the pattern of inactivation of hydrogenase activity by oxygen and activities of catalase and ascorbate peroxidase. *Microbiol. Read. Engl.* 142 ( Pt 1), 207–211.
- Palágyi-Mészáros, L.S., Maróti, J., Latinovics, D., Balogh, T., Klement, E., Medzihradzsky, K.F., Rákhely, G., and Kovács, K.L. (2009). Electron-transfer subunits of the NiFe hydrogenases in *Thiocapsa roseopersicina* BBS. *FEBS J.* 276, 164–174.
- Parales, R.E., and Harwood, C.S. (1993). Construction and use of a new broad-host-range *lacZ* transcriptional fusion vector, pHRP309, for gram- bacteria. *Gene* 133, 23–30.
- Peters, J.W. (1999). Structure and mechanism of iron-only hydrogenases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9, 670–676.
- Peters, J.W., Stowell, M.H., Soltis, S.M., Finnegan, M.G., Johnson, M.K., and Rees, D.C. (1997). Redox-dependent structural changes in the nitrogenase P-cluster. *Biochemistry (Mosc.)* 36, 1181–1187.
- Peters, J.W., Lanzilotta, W.N., Lemon, B.J., and Seefeldt, L.C. (1998). X-ray crystal structure of the Fe-only hydrogenase (CpI) from *Clostridium pasteurianum* to 1.8 angstrom resolution. *Science* 282, 1853–1858.
- Petkun, S., Shi, R., Li, Y., Asinas, A., Munger, C., Zhang, L., Waclawek, M., Soboh, B., Sawers, R.G., and Cygler, M. (2011). Structure of hydrogenase maturation protein HypF with reaction intermediates shows two active sites. *Struct. Lond. Engl.* 19, 1773–1783.
- Pfennig, N., and Trüper, H.G. (1983). Taxonomy of phototrophic green and purple bacteria: a review. *Ann. Microbiol. (Paris)* 134B, 9–20.
- Pierik, A.J., Roseboom, W., Happe, R.P., Bagley, K.A., and Albracht, S.P. (1999). Carbon monoxide and cyanide as intrinsic ligands to iron in the active site of [NiFe]-hydrogenases. NiFe(CN)<sub>2</sub>CO, Biology's way to activate H<sub>2</sub>. *J. Biol. Chem.* 274, 3331–3337.
- Pimentel, D. (1991). Global warming, population growth, and natural resources for food production. *Soc. Nat. Resour.* 4, 347–363.
- Przybyla, A.E., Robbins, J., Menon, N., and Peck, H.D., Jr (1992). Structure-function relationships among the nickel-containing hydrogenases. *FEMS Microbiol. Rev.* 8, 109–135.
- Rákhely, G., Colbeau, A., Garin, J., Vignais, P.M., and 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, 1460–1465.

- Rákhely, G., Zhou, Z.H., Adams, M.W., and Kovács, K.L. (1999). Biochemical and molecular characterization of the [NiFe] hydrogenase from the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus litoralis*. *Eur. J. Biochem. FEBS* 266, 1158–1165.
- Rákhely, G., Kovács, A.T., Maróti, G., Fodor, B.D., Csanádi, G., Latinovics, D., and Kovács, K.L. (2004). Cyanobacterial-type, heteropentameric, NAD<sup>+</sup>-reducing NiFe hydrogenase in the purple sulfur photosynthetic bacterium *Thiocapsa roseopersicina*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 722–728.
- Rákhely, G., Laurinavichene, T.V., Tsygankov, A.A., and Kovács, K.L. (2007). The role of Hox hydrogenase in the H<sub>2</sub> metabolism of *Thiocapsa roseopersicina*. *Biochim. Biophys. Acta* 1767, 671–676.
- Reissmann, S., Hochleitner, E., Wang, H., Paschos, A., Lottspeich, F., Glass, R.S., and Böck, A. (2003). Taming of a poison: biosynthesis of the NiFe-hydrogenase cyanide ligands. *Science* 299, 1067–1070.
- Rey, F.E., Oda, Y., and Harwood, C.S. (2006). Regulation of uptake hydrogenase and effects of hydrogen utilization on gene expression in *Rhodospseudomonas palustris*. *J. Bacteriol.* 188, 6143–6152.
- Ribbe, M., Gadkari, D., and Meyer, O. (1997). N<sub>2</sub> fixation by *Streptomyces thermoautotrophicus* involves a molybdenum-dinitrogenase and a manganese-superoxide oxidoreductase that couple N<sub>2</sub> reduction to the oxidation of superoxide produced from O<sub>2</sub> by a molybdenum-CO dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 272, 26627–26633.
- Rossi, M., Pollock, W.B., Reij, M.W., Keon, R.G., Fu, R., and Voordouw, G. (1993). The hmc operon of *Desulfovibrio vulgaris* subsp. *vulgaris* Hildenborough encodes a potential transmembrane redox protein complex. *J. Bacteriol.* 175, 4699–4711.
- Rupprecht, J., Hankamer, B., Mussgnug, J.H., Ananyev, G., Dismukes, C., and Kruse, O. (2006). Perspectives and advances of biological H<sub>2</sub> production in microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72, 442–449.
- Sasikala, K., Ramana, C.V., Rao, P.R., and Kovacs, K.L. (1993). Anoxygenic Phototrophic Bacteria: Physiology and Advances in Hydrogen Production Technology. In *Advances in Applied Microbiology*, Saul Neidleman and Allen I. Laskin, ed. (Academic Press), pp. 211–295.
- Sauter, M., Böhm, R., and Böck, A. (1992). Mutational analysis of the operon (hyc) determining hydrogenase 3 formation in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 6, 1523–1532.
- Sawers, G. (1999). The aerobic/anaerobic interface. *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 181–187.
- Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G., and Pühler, A. (1994). Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* 145, 69–73.

- SCHLEGEL, H.G., KALTWASSER, H., and GOTTSCHALK, G. (1961). [A submersion method for culture of hydrogen-oxidizing bacteria: growth physiological studies]. *Arch. Für Mikrobiol.* 38, 209–222.
- Schmitz, O., Boison, G., Salzman, H., Bothe, H., Schütz, K., Wang, S., and Happe, T. (2002). HoxE—a subunit specific for the pentameric bidirectional hydrogenase complex (HoxEFUYH) of cyanobacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 1554, 66–74.
- Schneider, K., and Schlegel, H.G. (1976). Purification and properties of soluble hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus* H 16. *Biochim. Biophys. Acta* 452, 66–80.
- Shima, S., and Thauer, R.K. (2007). A third type of hydrogenase catalyzing H<sub>2</sub> activation. *Chem. Rec. N. Y. N* 7, 37–46.
- Soboh, B., Stripp, S.T., Muhr, E., Granich, C., Brausseman, M., Herzberg, M., Heberle, J., and Gary Sawers, R. (2012). [NiFe]-hydrogenase maturation: isolation of a HypC-HypD complex carrying diatomic CO and CN- ligands. *FEBS Lett.* 586, 3882–3887.
- Soboh, B., Stripp, S.T., Bielak, C., Lindenstrauß, U., Brausseman, M., Javaid, M., Hallensleben, M., Granich, C., Herzberg, M., Heberle, J., et al. (2013). The [NiFe]-hydrogenase accessory chaperones HypC and HybG of *Escherichia coli* are iron- and carbon dioxide-binding proteins. *FEBS Lett.* 587, 2512–2516.
- Stewart, W.D., Fitzgerald, G.P., and Burris, R.H. (1967). In situ studies on N<sub>2</sub> fixation using the acetylene reduction technique. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 58, 2071–2078.
- Stripp, S.T., Soboh, B., Lindenstrauß, U., Brausseman, M., Herzberg, M., Nies, D.H., Sawers, R.G., and Heberle, J. (2013). HypD Is the Scaffold Protein for Fe-(CN)<sub>2</sub>CO Cofactor Assembly in [NiFe]-Hydrogenase Maturation. *Biochemistry (Mosc.)*.
- Tamagnini, P., Axelsson, R., Lindberg, P., Oxelfelt, F., Wünschiers, R., and Lindblad, P. (2002). Hydrogenases and hydrogen metabolism of cyanobacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* 66, 1–20, table of contents.
- Tamagnini, P., Leitão, E., Oliveira, P., Ferreira, D., Pinto, F., Harris, D.J., Heidorn, T., and Lindblad, P. (2007). Cyanobacterial hydrogenases: diversity, regulation and applications. *FEMS Microbiol. Rev.* 31, 692–720.
- Theodoratou, E., Huber, R., and Böck, A. (2005). [NiFe]-Hydrogenase maturation endopeptidase: structure and function. *Biochem. Soc. Trans.* 33, 108–111.
- Vignais, P.M., and Billoud, B. (2007). Occurrence, classification, and biological function of hydrogenases: an overview. *Chem. Rev.* 107, 4206–4272.
- Vignais, P.M., and Colbeau, A. (2004). Molecular biology of microbial hydrogenases. *Curr. Issues Mol. Biol.* 6, 159–188.



- Vignais, P.M., Billoud, B., and Meyer, J. (2001). Classification and phylogeny of hydrogenases. *FEMS Microbiol. Rev.* 25, 455–501.
- Vignais, P.M., Magnin, J.-P., and Willison, J.C. (2006). Increasing biohydrogen production by metabolic engineering. *Int. J. Hydrog. Energy* 31, 1478–1483.
- Volbeda, A., Charon, M.H., Piras, C., Hatchikian, E.C., Frey, M., and Fontecilla-Camps, J.C. (1995). Crystal structure of the nickel-iron hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*. *Nature* 373, 580–587.
- Volbeda, A., Fontecilla-Camps, J.C., and Frey, M. (1996). Novel metal sites in protein structures. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6, 804–812.
- Volbeda, A., Montet, Y., Vernède, X., Hatchikian, E.C., and Fontecilla-Camps, J.C. (2002). High-resolution crystallographic analysis of *Desulfovibrio fructosovorans* [NiFe] hydrogenase. *Int. J. Hydrog. Energy* 27, 1449–1461.
- Watanabe, S., Matsumi, R., Arai, T., Atomi, H., Imanaka, T., and Miki, K. (2007). Crystal structures of [NiFe] hydrogenase maturation proteins HypC, HypD, and HypE: insights into cyanation reaction by thiol redox signaling. *Mol. Cell* 27, 29–40.
- Wolfe, A.J. (2005). The acetate switch. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* MMBR 69, 12–50.
- Yeang, H.Y., Yusof, F., and Abdullah, L. (1998). Protein purification for the Lowry assay: acid precipitation of proteins in the presence of sodium dodecyl sulfate and other biological detergents. *Anal. Biochem.* 265, 381–384.
- Zhu, J., and Shimizu, K. (2004). The effect of pfl gene knockout on the metabolism for optically pure D-lactate production by *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64, 367–375.
- Zirngibl, C., Van Dongen, W., Schwörer, B., Von Büнау, R., Richter, M., Klein, A., and Thauer, R.K. (1992). H<sub>2</sub>-forming methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase, a novel type of hydrogenase without iron-sulfur clusters in methanogenic archaea. *Eur. J. Biochem. FEBS* 208, 511–520.

---

# KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

---

Szeretnék köszönetet mondani mindenkinek, aki segített abban, hogy ez a munka elkészülhessen:

**Dr. Rákhely Gábornak,**

hogy vállalkozott arra, hogy az elmúlt évek során lelkiismeretes, precíz és segítőkész mentorom legyen a molekuláris biológiai kutatómunkában. Mindig számíthattam rá, és a széleskörű szakmai tudására.

**Prof. Kovács Kornélnak,**

hogy munkámat támogatta, figyelemmel kísérte és jobbító kritikáival, tanácsaival ellátott.

**Dr. Maróti Gergelynek**

aki a pályám elején egyengette az utamat és közelebről is megismertetett a tudományos kutatómunkával.

Külön köszönettel tartozom az **SzTE Biotechnológiai Tanszék** és az **MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont Biofizikai Intézet** minden egykori és jelenlegi dolgozójának, a munkám sikeréhez való hozzájárulásukért, valamint **Verebély Rózsának** a technikai segítségéért.

Külön köszönöm **Dr. Herbel Zsófiának, Dr. Szőri-Dorogházi Emmának, Latinovics Dórának, Kis Ágnesnek, Szilágyi Árpádnak, Tengölics Rolandnak, Győri Editnek** és minden kedves munkatársamnak a számtalan örömteli pillanatot, beszélgetést, önzetlen segítséget, a sok erőt és biztatást, amit kaptam a munkahelyen és a magánéletben egyaránt.

Köszönetet szeretnék mondani **szüleimnek, bátyáimnak**, akikre az életem minden területén bármikor támaszkodhattam, és egy kiegyensúlyozott családi háttér biztosításával közvetetten segítették szakmai előrehaladásomat. Tanulmányaim során mindvégig biztattak és támogattak.

Hálás szívvel köszönöm férjemnek, **Dr. Blaszó Péternek** a szeretetét, hogy mindvégig mellettem állt, támogatott és hitt bennem.

Legvégül pedig köszönettel tartozom a TÁMOP 4.2.4. Nemzeti Kiválósági Programnak, hogy a Jedlik Ányos ösztöndíjjal támogattak.

---

# SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

---

## A dolgozat alapjául szolgáló közlemények

**Andrea Nyilasi**, Gergely Maróti, Tímea Balogh, Kornél L. Kovács, Gábor Rákhely (2014) Heterologous functionality and roles of conserved cysteine motifs of the [NiFe]-hydrogenase accessory protein, HupK/HoxV, International Journal of Hydrogen Energy (in press); IF: 3.548

**Andrea Nyilasi**, Éva Molnos, Szabolcs Lányi, Iosif Nagy, Gábor Rákhely, Kornél L. Kovács (2013) Photofermentative production of hydrogen from organic acids by the purple sulfur bacterium *Thiocapsa roseopersicina*, International Journal of Hydrogen Energy 38:(14) pp. 5535-5544. IF: 3.548

## Egyéb közlemények, konferencia kiadványok

Emma Szőri-Dorogházi, Gergely Maróti, Milán Szőri, **Andrea Nyilasi**, Gábor Rákhely, Kornél L. Kovács (2012) Analyses of the large subunit histidine-rich motif expose an alternative proton transfer pathway in [NiFe] hydrogenases, Plos One (4) Paper N°e34666. 11 p.; IF: 4,411

**Andrea Nyilasi**, Zsolt Horváth, Kornél L. Kovács, Gábor Rákhely (2013) Hydrogen production from lactate by a purple sulfur phototrophic bacterium, Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica 60:(Suppl. 1.) pp. 200-201.

Kovács Kornél, Fülöp András, Herbel Zsófia, **Nyilasi Andrea**, Rákhely Gábor (2010) Tiszta, megújuló energia a biohidrogén, Környezetvédelem XVIII.(2):20-21

**Andrea Nyilasi**, Gergely Maróti, Gábor Rákhely, Kornél L. Kovács. (2005) Investigation of HupK hydrogenase accessory protein in *Thiocapsa roseopersicina*, Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica 52, 113-114.

Éva Klement, Krisztina Buzás, Gergely Maróti, Barna Fodor, Ákos T. Kovács, Dóra Latinovics, Lívía Mészáros, Réka Dávid, **Andrea Nyilasi**, Judit Balogh, Gábor Rákhely, Kornél L. Kovács, Katalin F. Medzihradszky. (2005) Mass spectral identification of interacting proteins in the biosynthesis of Ni-Fe hydrogenases, *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 52, 75-76.

**Andrea Nyilasi**, Kornél L. Kovács, Gábor Rákhely (2009) Investigation of the maturation of NiFe hydrogenases in *Thiocapsa roseopersicina*, *Acta Biologica Szegediensis*, 53 (No. 1), 70

Éva Molnos, **Andrea Nyilasi**, Gábor Rákhely, Ovidiu Muntean, Kornél L. Kovács (2010) Photofermentative production of hydrogen by *Thiocapsa roseopersicina* from Simple organic substrates, *Hungarian Journal of Industrial Chemistry*, 38. (2), 117-121