

HIDROGENÁZ ENZIMEK VIZSGÁLATA
***METHYLOCOCCUS CAPSULATUS* (BATH)-BAN**

Doktori értekezés

Készítette:

Hanczár Tímea

Témavezető:

Prof. Kovács L. Kornél

Szegedi Tudományegyetem Biotechnológiai Tanszék
MTA SzBK Biofizikai Intézet

Szeged
2003

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	5
Bevezetés.....	7
1. Irodalmi áttekintés.....	8
1.1. Egyszénatomos vegyületek a biológiában.....	8
1.2. A metán szerepe a globális felmelegedésben.....	9
1.3. Metántermelők és fogyasztók a bioszférában.....	9
1.4. A metanotrófok biotechnológiai hasznosítási lehetőségei.....	10
1.5. A metanotróf baktériumok.....	12
1.5.1. A metanotrófok felosztása.....	12
1.5.2. A metanotróf baktériumok fiziológiája.....	13
1.5.3. Metán monooxigenázok.....	15
1.6. Hidrogenáz enzimek.....	18
1.6.1. Hidrogenáz aktivitás a metanotróf baktériumokban.....	20
1.6.2. A hidrogenázok három filogenetikailag különböző osztálya.....	21
1.6.2.1. [NiFe] hidrogenázok.....	22
1.6.2.2. [Fe] tartalmú hidrogenázok.....	22
1.6.2.3. Fémment nem tartalmazó hidrogenázok.....	22
1.6.3. Származástani kapcsolatok.....	23
1.6.4. Sejtbeli lokalizáció.....	24
1.6.5. Hidrogenáz gének.....	24
1.6.6. Szolubilis hidrogenázok.....	25
1.6.7. Hidrogenázok fiziológiai szerepe.....	27
1.6.8. Hidrogenáz aktivitásmérés.....	33
1.6.8.1. Aktivitásmérési technikák (14).....	33
1.6.8.2. Az oxigén szerepe (2).....	35
1.7. A hidrogén anyagcserével kapcsolatba hozható enzimek.....	35
2. Célkitűzések.....	37
2.1. Általános célkitűzés.....	37
2.2. Részletes célkitűzés.....	37
3. Anyagok és módszerek.....	38
3.1. Tápoldatok és táptalajok.....	38
3.1.1. Folyadékkultúra.....	38

3.1.2. Tenyésztés szilárd táptalajon.....	38
3.2. Fermentorkultúra	39
3.3. Szolubilis és membrán frakció preparálása	39
3.4. A pH függés meghatározásához használt pufferek	39
3.5. Hőkezelés	40
3.6. Sejtek permeabilizálása detergenssel	40
3.7. Fehérje meghatározás	40
3.8. Hidrogenáz aktivitásmérés	40
3.8.1. Hidrogénfejlesztő aktivitásmérés	40
3.8.2. Hidrogén felvevő aktivitásmérés egész sejtekkel.....	41
3.9. sMMO aktivitás detektálás	42
3.10. Hidrogén hajtott metán monooxigenáz (pMMO és sMMO) aktivitásmérés.....	42
3.11. Poliakrilamid-gélelektroforézis (PAGE).....	43
3.12. Fehérjék gélben való detektálása.....	43
3.13. Hidrogén felvevő aktivitás detektálása poliakrilamid fehérjegélben	43
3.14. Standard DNS technikák	44
3.14.1. Kromozómális DNS izolálása metanotróf törzsekből	44
3.14.2. Plazmid tisztítás <i>Escherichia coli</i> -ből	44
3.14.3. DNS emésztése restrikciós enzimekkel.....	44
3.14.4. Agaróz gélelektroforézis	45
3.14.5. DNS izolálása gélből	45
3.14.6. Polimeráz láncreakció (PCR).....	45
3.14.7. Ligálás	46
3.14.8. Kompetens sejt készítés kémiai módszerrel.....	46
3.14.9. Transzformálás	46
3.14.10. Konjugálás.....	46
3.14.11. PCR termékek klónozása	47
3.14.11.1. <i>hupSL</i> mutáns előállítása.....	47
3.14.11.2. <i>hoxH</i> mutáns előállítása	48
3.14.12. Southern hibridizáció	48
3.14.12.1. Digoxigeninnel jelölt próba készítése	49
3.14.12.2. Southern blot, hibridizálás és detektálás	49
4. Eredmények és értékelésük	51
4.1. A hidrogén és a metán anyagcsere közötti kapcsolat.....	51

4.2. Hidrogenáz enzim (ek) kimutatása aktivitásmérésekkel	51
4.3. Az aktivitás lokalizációja	55
4.4. Hidrogenáz gének.....	56
4.4.1. Membránkötött hidrogenáz gének azonosítása	56
4.4.2. Szolubilis hidrogenáz gének azonosítása	56
4.4.3. Membránkötött hidrogenáz mutáns létrehozása.....	57
4.4.4. Szolubilis hidrogenáz mutáns létrehozása.....	59
4.4.5. Hidrogenáz struktúrgének térképezése metanotrófokban	61
4.4.5.1. Membránkötött hidrogenáz gének keresése	62
4.4.5.2. Szolubilis hidrogenázt kódoló gének keresése.....	63
4.5. Hidrogenáz enzim (ek) biokémiai jellemzése	64
4.5.1. Különböző növesztési körülmények: konstitutív vagy indukálható az aktivitás?..	64
4.5.2. Nikkelfüggés	67
4.5.2.1. Membránkötött hidrogenáz	67
4.5.2.2. Szolubilis hidrogenáz aktivitás nikkel függése	69
4.5.3. pH optimum meghatározása.....	70
4.5.4. Hőkezelés	71
4.6. Hidrogenázok fiziológiai szerepe.....	72
4.6.1. A membránkötött enzim fiziológiai szerepének meghatározása.....	72
4.6.2. Szolubilis hidrogenáz	73
4.6.3. Hidrogenáz, mint redukáló erőforrást biztosító enzim az <i>in vivo</i> membránkötött és szolubilis metán monooxigenáz aktivitás mérések esetén	73
5. Összefoglalás.....	76
6. Hivatkozások jegyzéke.....	78
A dolgozat témájához szorosan kapcsolódó saját közlemények jegyzéke.....	87
További közlemények	88
Köszönetnyilvánítás	90
Summary	91

Rövidítések jegyzéke

BCIP: 5-bróm-4-klór-3-indolil-foszfát

BV: Benzilviologén

CTAB: N-acetil-N,N,N-trimetil-ammonium bromid

CSPD: 3-(4-metoxispiro 4-il) fenil foszfát

DIG: Digoxigenin

DMSO: Dimetilszulfoxid

EDTA: Etiléndiamin-tetraecetsav dinátrium sója

EtBr: Etidium-bromid

g: Nehézségi gyorsulás

HEPES: N-(2-hidroxietyl) piperazin-N'-(2-etánszulfonsav) nátrium sója

IPTG: Izopropil- β -D-tiogalaktozid

kb: Kilóbázis

kDa: KiloDalton

LB: Luria-Bertani

MK: Metilénkék

MOPS: 3-morfolin-propánszulfonsav

MV: Metilviologén

NAD: Nikotinamid adenin dinukleotid

NBT: Nitroblue-tetrazolium

OD: Optikai denzitás

ONPG: o-nitrofenil- β -D-galaktozid

PCR: Polimeráz láncreakció

pMMO: Partikuláris metán monooxygenáz

ppm: milliomod rész (parts/million)

SDS: Nátrium-dodecil-szulfát

sMMO: Szolubilis metán monooxygenáz

SOB: NaCl, Bacto tripton, élesztőkivonat

SSC: NaCl, tri-nátrium-citrát

TAE: Tris- acetát, EDTA

TB: Tris-borát

TCE: Triklór-etilén

TE: Tris-Cl, EDTA

TRIS: Tris-(hidroximetil)-metilamin

X-gal: 5-bróm-4-klór-3-indolil- β -D-galaktozid

Bevezetés

A természetes (emberi beavatkozástól mentes) körülmények között élő mikroorganizmusok évente kb. 400 millió tonna metánt termelnek (24). Az emberi tevékenységnek köszönhető biogén metántermelés (pl.: rizsföldek) kb. 550 millió tonnával járul hozzá az évenkénti globális metán produkcióhoz (kb. 1200 millió tonna) (52). Ennek a roppant nagy tömegnek nagyon lényeges az emberiségre gyakorolt hatása. A metán a szerves anyagok anaerob lebomlása során, természetes vagy mesterséges környezetben keletkező, a Föld légterében és a földgázban, legnagyobb mennyiségben előforduló, legstabilabb szerves gáz. Az atmoszférába jutva a globális felmelegedés mértékének növekedését eredményezi, valamint megváltoztatja az atmoszféra kémiai összetételét [5. oldal].

Érthető tehát, hogy napjainkban a metánkibocsátás mérséklése az emberiség - környezete megóvása érdekében teendő- legfontosabb feladatai közé tartozik. A cél olyan hatékony, költségkímélő, gazdaságos és természetesen környezetbarát technológiák kifejlesztése, melyek alkalmazása a globális metánemisszió mérséklését eredményezi. Megfigyelhetjük, hogy az új technológiák között napjainkban egyre elterjedtebb a biotechnológia. A metán kibocsátás mérsékléséhez [8. oldal], toxikus, halogénezett vegyületek lebontásához [9. oldal], valamint a biológiai úton történő metanol termeléshez [10. oldal] a metanotróf baktériumok révén a természet maga kínálja a lehetőséget.

A metanotróf baktériumok MMO enzimrendszere egy mol redukált ekvivalenst igényel az általa katalizált oxidációs reakcióhoz. Fiziológiai körülmények között ez a redukáló erő csak részben regenerálódik. A bakteriális növekedéshez ugyanis egyéb anyagcsere-útvonalak nyílnak, így a formaldehid és a hangyasav oxidációja során keletkező redukált koenzim teljes egészében nem fedezi a MMO-k regenerálásához szükséges redukált kofaktor igényt. A redukált koenzim mérleg egyensúlyának fenntartásához egyéb redukáló erőre van szükség.

In vitro, és biodegradációs, biokonverziós alkalmazások esetén szükség van egy környezetvédelmi szempontból megfelelő redukálószerre. A hidrogén az MMO egy ígéretes alternatív redukáló forrása. Olcsó, környezetbarát szubsztrát, amely a hidrogenáz enzim segítségével képes a baktériumok redox kofaktorainak és enzimeinek a redukálására.

1. Irodalmi áttekintés

1.1. Egyszénatomos vegyületek a biológiában

Az egyszénatomos vegyületek a metán és széndioxid közötti valamennyi oxidációs állapotukban megtalálhatóak a természetben.

A metán elsősorban szén és olajlelőhelyeken fordul elő, illetve számos fermentációs folyamat végterméke. A kérődző állatok emésztési folyamatai során jelentős mennyiségű metán keletkezik. Ez korántsem elhanyagolható tényező, ha figyelembe vesszük, hogy az Egyesült Királyságban ma élő szarvasmarha állomány képes lett volna a „Hindenburg” léghajót 114 perc alatt megtölteni metánnal (52). Ettől természetesen a léghajó még nem tudott volna repülni.

A metanol a természetben található különféle szerves észterek, éterek (pl.: pektin) lebomlásából származhat.

Metilált aminok vagy oxidok igen elterjedtek a növényi és állati szövetekben egyaránt.

A hangyasav leginkább a növényi és állati szövetekben a szénhidrátok erjedéses metabolizmusa során keletkezik.

A széndioxid természetes módon jelen van az atmoszférában, a természetes vizekben és karbonátok formájában a földben is megtalálható.

Ezért aztán nem meglepő, hogy számos mikroorganizmusban fejlődött ki olyan típusú anyagcsere, mely révén képessé váltak ezeknek a vegyületeknek szén- és/vagy energiaforrásként való hasznosítására.

1.2. A metán szerepe a globális felmelegedésben

Évente megközelítőleg 500 millió tonna metán jut a légkör legalsó, 8-12 km magasságig terjedő részébe, a troposzférába. A légkörbe jutó metán megzavarja a troposzféra hidroxilgyök- és ózonháztartását. Ennek kb. 90%-a fotokémiai reakciók során oxidálódik (38). A légköri metán növekedésével a hidroxilgyökök koncentrációja csökkenni fog, és ez megnöveli a légköri metán élettartamát. A metán oxidációja azt eredményezi, hogy ha 1 mol metán lebomlik a légkörben, akkor ezzel arányban 0,22 mollaal csökken a hidroxilgyökök mennyisége. A hidroxilgyökök koncentrációjának csökkenése miatt a metán élettideje 2050-ig akár 20%-kal is nőhet (38).

A metánkibocsátás csökkenése a hidroxilgyök-koncentráció növekedésén keresztül megnöveli a troposzféra oxidáló képességét, ez pedig a levegő tisztaságának javulását eredményezi.

A troposzférában megmaradó, el nem oxidálódott metán közrejátszik az üvegházhatás kialakításában is az infravörös sugarak -CO_2 -nál sokkal hatékonyabb- abszorpciója miatt. A metán kb. 26-szor hatékonyabban járul hozzá az éghajlat változásához, mint a széndioxid (tömegszázalékban mérve) (21).

Az utóbbi 300 évben a légköri metán koncentrációja 0,75-ről 1,7 ppm-re növekedett.

Az utóbbi évtizedekben évről-évre átlagosan 1%-kal fokozódik a légkörbe jutó metán mennyisége. Becslések szerint a légkör metán koncentrációja 2050-re eléri a 2,1-4,0 ppm-et (38). Ma a légköri metánkibocsátás 60%-a az ember tevékenységéhez kapcsolódik (mezőgazdasági és ipari emisszió) és ennek mértéke évről évre fokozódik. Ha az éves metánkibocsátás változatlan ütemben nő, a következő évszázadban az üvegházhatás 25%-áért már a metán lesz felelős!

Számítások szerint a metánemisszió 10%-os csökkenése stabilizálná a gáz jelenlegi atmoszférikus koncentrációját. Ezért nagyon fontos az atmoszférikus metántermelő és -fogyasztó folyamatok pontos megismerése, hogy felismerhessük azokat a lépéseket, melyeket a metán által okozott üvegházhatás mértékének csökkentése érdekében kell tennünk (39).

1.3. Metántermelők és fogyasztók a bioszférában

A metánt termelő metanogén archaeák mellett a természet metánt hasznosító mikroorganizmusokról is gondoskodott.

A biogén metántermelést a szigorúan anaerob metanogén archaeabaktériumok végzik, a metanotrófoknak a metán lebontásához pedig szükségük van oxigénre. Ezért metanotróf baktériumok főképp az aerob és anaerob határfelületek mentén fordulnak elő, ahol a metán az anaerob rétegből az aerob rétegbe kerül, pl. talajban, földgázmezőkön, metánnal átjárt mocsarakban, állóvizekben, iszapban. Így a metanotróf mikroorganizmusok nagyon fontos szerepet töltenek be a légköri metánkibocsátás szabályzásában.

1.4. A metanotrófok biotechnológiai hasznosítási lehetőségei

A különleges anyagcsere-útvonal alapján kínálkozó széles körű alkalmazási lehetőségek az utóbbi évtizedekben a metanotróf baktériumok tanulmányozására irányították a kutatók figyelmét. A mikrobiális úton történő metán oxidációt napjainkban a tengeri és vízenyős területek üledékein keresztül a sivatagok talajáig, széles körben tanulmányozzák.

A metán oxidációjának első lépését katalizáló enzimek, a metán monooxygenázok, amellet, hogy a metánt metanollá oxidálják, képesek számos egyéb vegyület biológiai úton történő átalakítására is.

Napjainkban világszerte súlyos környezetvédelmi problémát jelentenek a természetben felhalmozódó toxikus anyagok. E vegyületek jelentős csoportját képezik a halogénezett szénhidrogének.

A szintetikus klórozott szénhidrogéneket nagyfokú stabilitásuk, és a csökkent tűz- és robbanásveszély miatt elterjedten használják oldószerként. Egyéb felhasználási területeik: fémek felületi tisztítására, polírozására, elektronikai alkatrészek, pl. félvezetők gyártásánál, textíliák vegytisztításához, kártevőkkel és gombákkal szemben fertőtlenítőszerként, zsírolószerként, a kávé koffeintartalmának kivonásához, általános érzéstelenítőként és műanyagipari oldószerként. Az ivóvíz klórozása során is keletkeznek klórozott metánszármazékok (38). A széles körű felhasználás, a gondatlan kezelés és tárolás a vegyületek stabilitásával párosulva, azt eredményezte, hogy mára a fejlett ipari országok, különösen az Egyesült Államok, Nyugat-Európa és Japán talajvízeiben a leggyakrabban kimutatott szennyező anyagok a szintetikus klórozott szénhidrogének (38). A leginkább elterjedt ezek közül a szennyező anyagok közül a triklóretilén (TCE), az 1,2-diklóretilén és a kloroform. Ezek közül a TCE a talajvizekben az egyik leggyakrabban előforduló szennyező vegyület, felezési ideje vizes közegben 300 nap (31). A TCE és más alifás, klórozott szénhidrogének jelenléte ivóvizeinkben toxicitásuk és karcinogén hatásuk miatt veszélyeztetni egészségünket. A TCE direkt toxicitása viszonylag alacsony, azonban az emlősök

szervezetébe kerülve a májban mérgező bomlástermékek keletkeznek belőle. A metanotrófok felhasználhatóságát elősegíti, hogy extrém magas halogénezett szénhidrogén koncentráció mellett (pl. 50 mg TCE/liter, ami az ivóvízben megengedett érték 10000-szerese) is megőrzik aktivitásukat (25).

A metanotrófok szolubilis metán monooxygenázának, az sMMO-nak jóval szélesebb a szubsztrát specificitása a pMMO-nál [az MMO-k részletes bemutatását a 14. oldalon adjuk meg] (12). Az sMMO képes alkánok, haloalkánok, alkének, éterek, ammónia, aromás és heterociklusos szénhidrogének oxidációjára. Az MMO-k katalitikus aktivitásának fenntartásához szükség van NADH-ra. A szennyezőanyag lebontás hatékonyságának növeléséhez ezért NADH-t illetve a gyakorlatban redukáló ágénst, pl. hangyasav sóit használnak. Erre azért van szükség, mert a szennyező anyagok lebontása jelentős redukált NAD^+ készletet von el a sejtektől, amelyet az oxidatív folyamatokból nem tudnak pótolni. Külsőleg adagolt redukálószerekkel, például hidrogénnel a gátlási folyamatot lassítani lehet. Egyes metanotróf baktériumok hidrogenáz enzime(ke)t tartalmaznak.

A metanotróf baktériumok alanyai lehetnek a metánból kiinduló metanol termelésnek is. A Föld fosszilis metán készletei a kőolaj készletekkel összemérhető nagyságúak, hasznosításuk azonban nehezkesebb, mert a térfogategységre számított energiasűrűsége kisebb. Ezért ma még óriási mennyiségű földgázt engednek el kihasználatlanul a világon a kőolaj-feldolgozás egyik káros melléktermékeként. Ezt az energiamennyiséget is többszörösen meghaladja a megújuló, biológiai rendszerek által termelt metán mennyisége. A legtöbb gyakorlati nehézség abból adódik, hogy a különböző forrásokból származó metán tárolása, szállítása jelentős költségnövelő tényező. Ezért gazdaságos felhasználási lehetőségei gyakran korlátozottak. Ha a metánt metanollá alakítják, ez a gond számottevően csökken: a metanol szállítása jóval egyszerűbben és tárolása biztonságosabban megoldható. A metanol a belső égésű motorok fontos alternatív üzemanyaga. Előnyei, hogy a benzinnél kevésbé környezetszennyező és kedvezőbb égési tulajdonságokkal rendelkezik, a benzinhez keverve pedig növeli az oktánszámot. Ezen kívül a metanol számos kémiai szintézis kiindulási vegyülete, a vegyipar egyik legfontosabb alapanyaga.

A Földön keletkező metán mintegy 60%-a (kb. 700 millió tonna/év) mikrobiológiai úton oxidálódik mielőtt a légkörbe jutna. A légkörbe jutó hozzávetőleg 500 millió tonna 90%-a a már említett fotokémiai reakciók során, 5% pedig mikrobiális oxidáció révén alakul át (38). Az éves atmoszférikus metánnövekedés így kb. 45 millió tonna. Az évente a légkörbe jutó metán mintegy 20%-a a kis és közepes volumenű metanol termelésben hasznosítható lenne.

Végül, de nem utolsó sorban, a metanotrófokat sikeresen alkalmazzák nagyüzemi méretekben egysejtfehérje termelésre is (9). Az egysejtfehérje termelésnél egyik legfontosabb tényező a fermentációs költségek számbavétele. A metanotrófok alkalmazásának egyik nagy előnye, hogy növesztésük egyszerű, biogázon vagy földgázon növeszthetők, a tápoldat olcsó, kizárólag szervesen sókat tartalmaz. A 45°C-on való növesztés pedig kizárja a patogén mikrobák elszaporodását, ezáltal a biomassza biztonságosan használható állati takarmányozásra.

1.5. A metanotróf baktériumok

A legelső részletesen leírt metánoxidáló baktériumot Sohngen izolálta 1906-ban és *Bacillus methanicus*-nak nevezte el (75). 1966-ig csak két új fajt izoláltak és írtak le: *Methanomonas methanooxidans*-t (10) és *Methylococcus capsulatus*-t (25).

1970-ben Whittenbury és munkatársai olyan dúsítási és izolálási eljárásokat fejlesztettek ki, amelyek számos új metanotróf törzs elkülönítéséhez vezettek. Több mint száz új faj vált ismerté, és a rendszerezés alapvető sémája is kialakult (85).

1.5.1. A metanotrófok felosztása

Az ismert metanotróf baktériumok nyolc nemzetségbe különíthetők el a nyugvó állapot alakja, az intracitoplazmatikus membrán finomsztruktúrája, a DNS bázisösszetétele, a 16S rRNS filogenetikai összehasonlítása és olyan fiziológiai jellegzetességek, mint a formaldehid-asszimiláció útvonala alapján. A törzsek a következő két típusba sorolhatók

I. Típus

Az ilyen típusú baktériumok korong alakú intracitoplazmatikus membránkötegekkel rendelkeznek, DNS-ük G+C tartalma 49-66 mol%. A formaldehidet ribulóz-monofoszfát (RuMP) útvonalon keresztül asszimilálják.

Az első típusba tartozó nemzetségek: *Methylomonas*, *Methylobacter*, *Methylomicrobium*, *Methylococcus*, *Methylocaldum* és a *Methylosphaera*.

II. Típus

Intracitoplazmatikus membránrendszerük lefutása párhuzamos a citoplazma membránéval. DNS-ük G+C tartalma 62-67 mol%. A formaldehid-asszimiláció a szerin útvonalon keresztül történik.

Az ide tartozó nemzetségek: *Methylosinus* és *Methylocystis*.

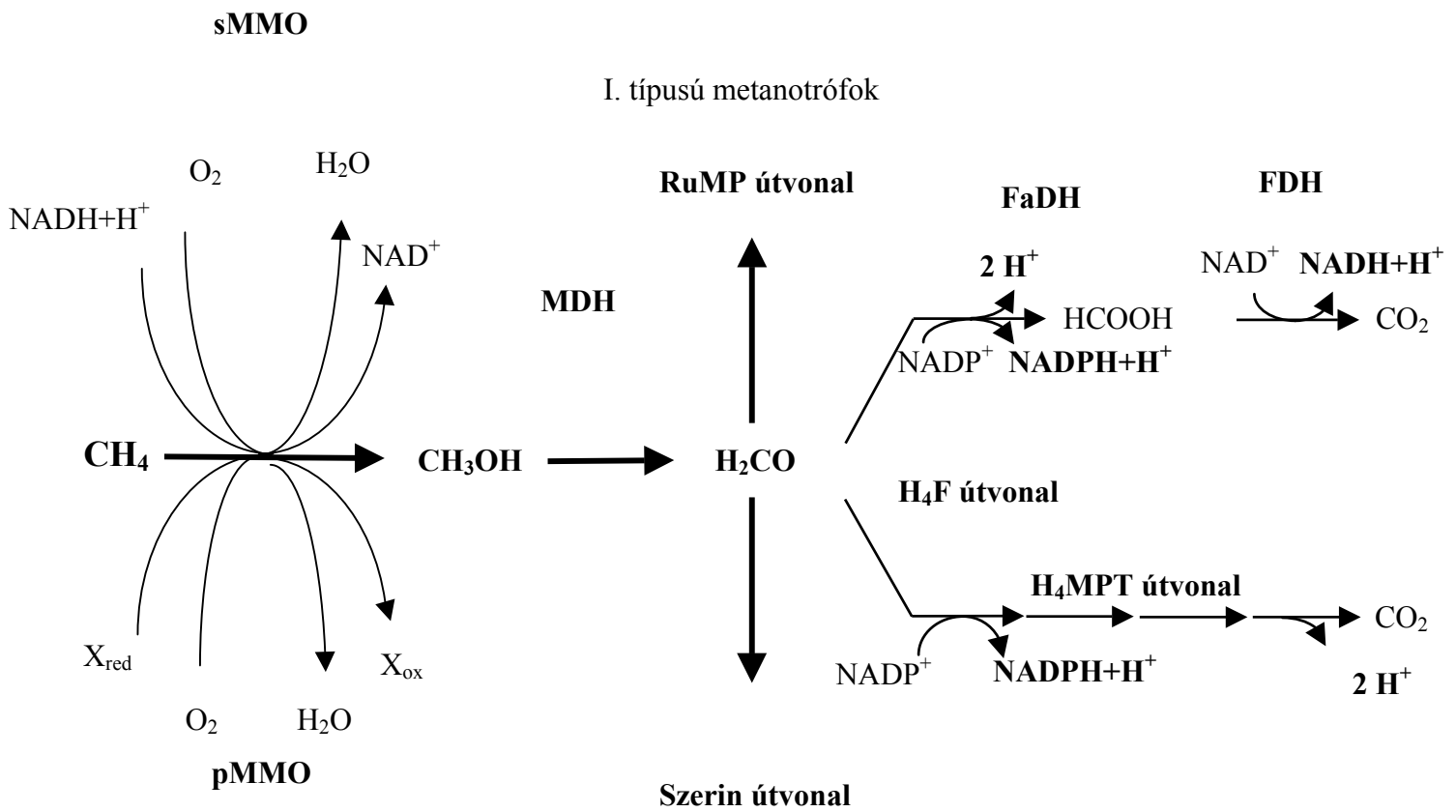
Az általam tanulmányozott *Methylococcus* nemzetség és az abba tartozó *M. capsulatus* (Bath) nem teljesen illik az első típusú metanotrófok közé, mivel metán anyagcsere-útvonalában a formaldehid asszimiláció szerin útvonala is megtalálható. Ezen kívül G+C tartalma is magasabb az első típusba sorolt metanotrófokhoz képest (84).

1.5.2. A metanotróf baktériumok fiziológiája

A metanotrófok fiziológiájának ismerete fontos a metabolizmust szabályozó faktorok és a metanotróf baktériumok ökológiájának megértéséhez. Az aerob anyagcserét folytató metanotrófokban a metánhasznosítás első lépésében a metán metanollá oxidálódik a metán monooxigenáz enzimkomplex segítségével. A MMO egy klasszikus monooxigenáz, amely két redukáló ekvivalenst használ fel az O₂ molekula kötéseinek felszakításához. Az egyik oxigén atom vízzé redukálódik két elektron és két proton felhasználásával, a másik pedig beépül a metán molekulába metanolt képezve.

Az endogén (MMO által oxidált metánból) és exogén forrásból származó (pl. pektin és lignin lebontásból) (38) metanol egy periplazmatikus metanol dehidrogenáz (MDH) segítségével formaldehiddé oxidálódik. A formaldehid ezután olyan több szénatomos intermedierekké alakul át, melyek képesek a metanotrófok központi anyagcsere-útvonalán keresztül a biomasszába beépülni. A metanotróf baktériumokban két formaldehid-asszimilációs út ismert: az ún. szerin és a RuMP útvonal. Ha a formaldehid nem épül be a sejt anyagaiba, akkor a formaldehid dehidrogenáz (FaDH) és a formát dehidrogenáz (FDH) segítségével széndioxidá oxidálódik (38) [1. Ábra].

A metanotróf baktériumokra általánosan jellemző, hogy növekedésük során tartalék tápanyagokat halmoznak fel, különösen, ha valamely tápanyagból (pl. nitrogén, oxigén) korlátozott mennyiség áll rendelkezésükre. A legáltalánosabban szintetizált tartalék tápanyag a polihidroxivajsav, illetve egyéb polihidroxialkánsavak (85).



II. típusú metanotrófok

- sMMO- szolubilis metán monooxygenáz
- pMMO partikuláris metán monooxygenáz
- MDH - metanol dehidrogenáz
- FaDH - formaldehid dehidrogenáz
- FDH - formát dehidrogenáz
- RuMP - ribulóz monofoszfát
- H₄F - tetrahydrofolát
- H₄MPT- tetrahydro-metanopterin

1. Ábra. A metánoxidáció útvonala.

1.5.3. Metán monooxygenázok

A metanotrófok metán oxidációjának első lépése egy különleges oxigenáz, a metán monooxygenáz (MMO) enzim segítségével történik. Az enzim két helyen lokalizálódhat a sejtekben, ennek alapján citoplazmában lokalizált, szolubilis (sMMO) és a belső membránhoz kötött, partikuláris (pMMO) metán monooxygenázt különböztetünk meg. A membránkötött, partikuláris monooxygenáz (pMMO) az összes ismert metanotrófban megtalálható. A citoplazmában lokalizált szolubilis metán monooxygenáz (sMMO) széles körben elterjedt a II. típusú metanotrófokban, míg az I. típusú baktériumoknak csak egy kisebb hányada –többek között a *Methylococcus capsulatus* törzsek és a *Methylomonas methanica* 68-1 (38) képes az sMMO szintézisére.

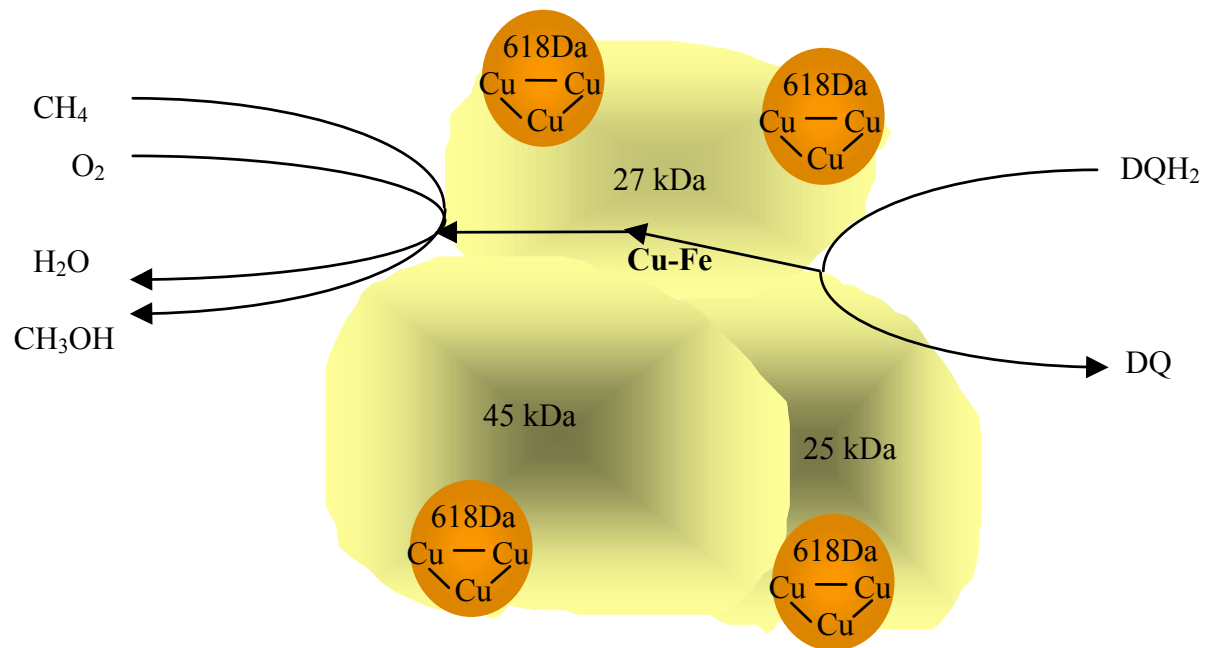
Az sMMO expressziója nem konstitutív, csak alacsony réz:biomassza arány esetén szintetizálódik. Az sMMO képződését tehát gátolják a Cu^{2+} ionok, csakúgy, mint aktivitását mind *in vivo*, mind *in vitro* körülmények között. A pMMO expressziójához és aktivitásához ezzel szemben réz ionok szükségesek (76). A két enzimrendszer egymástól független, a pMMO nem az sMMO membránhoz kapcsolódó változata.

Methylococcus capsulatus (Bath) *pmo* génklaszterét klónozták, szekvenálták (72). A klaszter három nyitott olvasási keretből áll (*pmoA*, *pmoB*, *pmoC*). Az alegységeket kódoló gének két példányban találhatóak meg a genomban, melyek mindössze 13 bázispárban térnek el egymástól. A *pmoC*-t pedig egy harmadik példányban is megtalálták (77). A *pmoA* az enzim 25 kDa-os alegységét, a *pmoB* pedig a 45 kDa molekulatömegű pMMO polipeptidet kódoló gén. Az enzim rezet tartalmaz és maximális aktivitásához réz szükséges. A pMMO enzim tanulmányozása nehéz feladat, ami az enzim nagyfokú *in vitro* instabilitásának köszönhető. Azonban metán limitált körülmények között ($28\text{--}34 \text{ dm}^3\text{h}^{-1}\text{l}^{-1}$), magas réz koncentrációjú ($20\mu\text{M}$) tápoldatban növesztve a baktériumot, nagy mennyiségű, viszonylag stabil, aktív pMMO-t tartalmazó membrán izolálható a baktériumból. Ezt követően klasszikus fehérjetisztítási módszerekkel sikerült az enzimet aktív formában tisztítani *Methylococcus capsulatus* (Bath)-ból (54).

A pMMO-n dolgozó csoportok egyetértenek abban, hogy az enzim rezet tartalmaz, és hogy minimum három (kb. 45, 27 és 25 kDa alegységből épül fel [2. Ábra] (7). Dalton és munkatársai által végzett kísérletek szerint az aktív pMMO enzim komplex (M_w : 99 kDa) 2,5 vas atomot és 14,5 réz atomot tartalmaz (7). A spektroszkópiai kísérletek szerint az aktív

centrum vasat és rézet is tartalmaz (44). A rézionok többsége egy 618 Da molekulatömegű peptidhez kapcsolódik, trinukleáris egységeket alkotva. Ezeknek a peptidnek a rézionok kötésén kívül az enzim stabilizálásában lehet szerepük.

Az sMMO lényegesen nagyobb *in vitro* stabilitása miatt a kezdetekben a figyelem erre a rendszerre irányult. Az sMMO-t a következő metanotrófokban tanulmányozták eddig: *Methylococcus capsulatus* (Bath) (20), *Methylosinus trichosporium* OB3b (29), *Methylobacterium* CRL-26 (57), *Methylosinus sporium* 5 (59), a *Methylocystis* M törzs (53) és a *Methylocystis* WI 14 (35).



2. Ábra. A pMMO enzimkomplex.

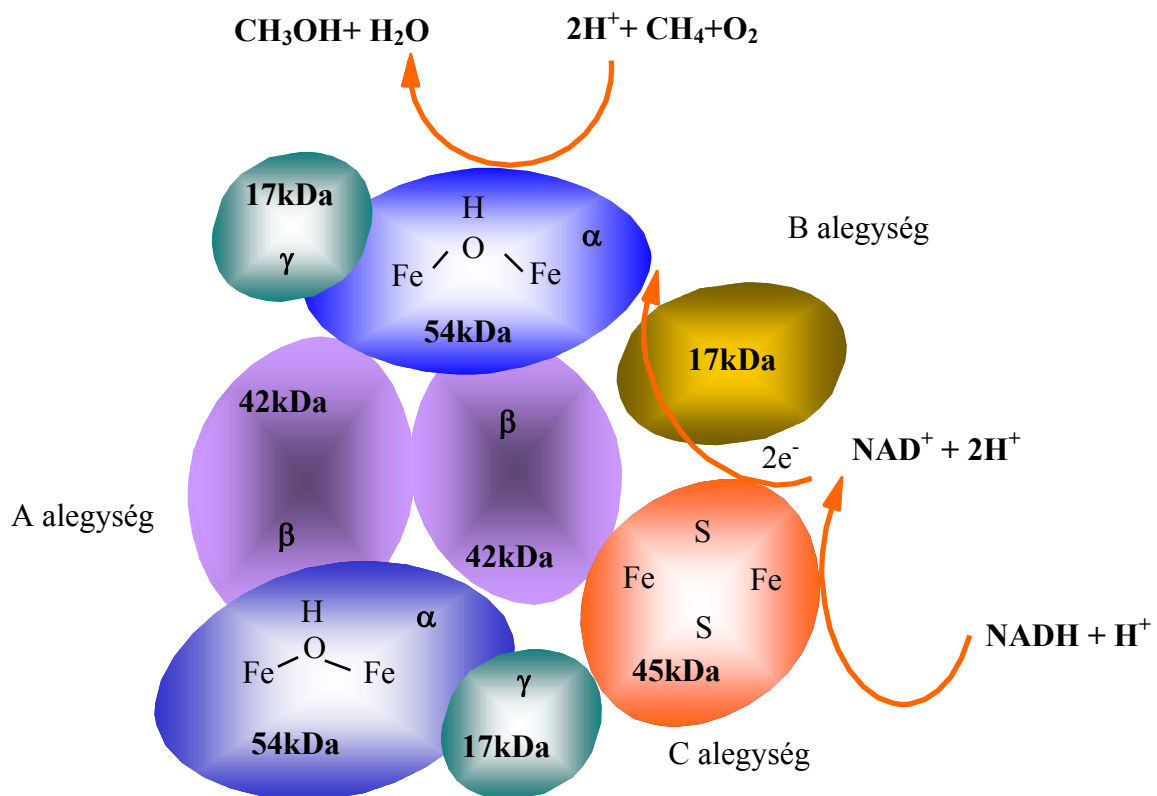
Az sMMO három protein komponensből áll:

- hidroxiláz (25 kDa)
- szabályzó (45 kDa)
- NADH-függő reduktáz (27 kDa) (17)

A komponensek közül a B és C egyetlen alegységből felépülő fehérjék, míg az A protein három alegységből áll össze, amelyeket α, β, γ - val szokás jelölni (86).

Az egyes komponensek részletesebb jellemzése, szerepük a katalitikus folyamatban:

A-komponens. Az sMMO hidroxiláz alegységének kristályszerkezetét sikerült meghatározni (64), mely három polipeptid féleségből épül fel, ezek molekulatömege 54, 42 és 17 kDa. A natív fehérjében az alegységek $(\alpha\beta\gamma)_2$ elrendezésben fordulnak elő (56) [3. Ábra]. Nem hem csoporthoz kötődő metalloprotein, 2-4 mol vasat tartalmaz fehérje molekulánként. A szétválasztott három alegység spontán újraegyesül az apoproteinné, az aktív hidroxiláz pedig a kettős vas-centrum beépülése révén jön létre (33); (26). A vas az egyetlen elem, amely katalitikusan aktív hidroxilázt tud kialakítani, más fématomokkal nem helyettesíthető.



3. Ábra. Az sMMO enzimkomplex.

B komponens. Egy 17 kDa molekulatömegű fehérje, amelynek egyáltalán nincs proszтетikus csoportja (32). Jelenléte elengedhetetlen a *Methylococcus capsulatus* hidroxilázának működéséhez, a *Methylosinus trichosporium*-ban található enzim aktivitását tízszeresére emeli, s nem szükséges a normális működéshez a *Methylobacterium* CRL-6-ban (26); (34).

A *M. capsulatus* (Bath) sMMO által katalizált reakció során az elektronok a NADH-ról a reduktázra vándorolnak, s onnan a hidroxilázra, ahol az oxigén feltehetően vízzé redukálódik (32). A B-komponens szerepe abban lehet, hogy szénhidrogén szubsztrát jelenlétében a NADH és a szubsztrát oxidációját összekapcsolja, szabályozva ez által az sMMO aktivitását: ha van szubsztrát, akkor hidroxilázként, ha nincs, akkor pedig oxidázként működhet.

C-komponens. Egyetlen polipeptid láncból álló 45 kDa-os vas-kén flavoprotein. Molekulánként egy flavin adenin dinukleotidot (FAD) és egy Fe_2S_2 centrumot tartalmaz (17); (18). A C fehérje a redukált NADH-tól átvett elektronokat megköti. Először a két elektron kötésére képes FAD centrum redukálódik, majd intramolekuláris elektrontranszfer következik a Fe_2S_2 centrumra (amely egyszerre csak egy elektron fogadására képes). Ezután az elektronok - egyesével - a reduktáz Fe_2S_2 centrumán keresztül az A-komponensre (hidroxiláz) kerülnek, ahol a metán oxidációja végbemegy.

A réz ionok irreverzibilisen gátolják az *in vivo* és *in vitro* sMMO aktivitást egyaránt. A réz ionok hatására a C-komponens struktúrája felbomlik a vas-kén centrum elvesztésével (34).

1.6. Hidrogenáz enzimek

A hidrogenáz az élővilágban előforduló legegyszerűbb molekula, a hidrogén képződését vagy lebontását katalizáló enzim, melyet elsősorban prokarióta szervezetekben tanulmányoztak részletesebben. Hidrogén metabolizmust különböző aspektusokból ez idáig több mint hatvan fajban vizsgáltak (14).

Hidrogenázt tartalmaznak többek között az enterobaktériumok (köztük az *Escherichia coli*), *Desulfovibrio* fajok, bíborbaktériumok, bíbor kénbaktériumok, (és a vizsgált metanotróf fajok egy része) éppúgy, mint a metánt termelő metanogének (87). Hidrogenáz enzimek baktériumokon és az archeákon kívül eukarióta szervezetek sejtszervecskéiben, mint például a protozoák hidrogenozómáiban és a zöld algák kloroplasztiszaiban is megtalálhatók.

Különös figyelem irányult azokra a csoportokra, melyek a hidrogént esszenciális energiaforrásként hasznosítják, pl. a metanogének (*Methanococcus*, *Methanobacterium*,

Methanosarcina), illetve képesek a hidrogént alternatív energiaforrásként felhasználni (*Ralstonia eutropha*, *Rhodobacter capsulatus*).

Más mikroorganizmusok hidrogenázai azért kerültek a figyelem középpontjába, mert a hidrogén metabolizmus szoros kapcsolatban van egyéb biokémiai és fiziológiai folyamatokkal. (pl. a nitrogénfixáló mikroorganizmusokban: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Anabaena*, *Azotobacter* és *Frankia* fajok) [21. oldal].

Egyre több baktériumról derült ki az utóbbi években, hogy két vagy több hidrogenáz enzimet is tartalmaznak, melyek a sejt különböző részeiben helyezkednek el [1. Táblázat]. Nem találtak hidrogenáz géneket olyan ismert szervezetekben, mint az élesztő az alacsonyabb fejlettségi fokon álló Eukarióták között, az Eubaktériumok köréből pedig olyan fontos fajokban, mint a *Haemophilus influenzae* és a *Mycobacterium tuberculosis* (14).

Az eddig tanulmányozott archaeák többsége tartalmaz hidrogenáz enzimet. A hidrogenázok mikroorganizmusokban fellelhető változatos típusban és számban való elterjedése (multiplicitása) [1. Táblázat] utal a hidrogén anyagcserében betöltött fontos szerepére, valamint lehetővé teszi a növekedési körülmények változásával bekövetkező energetikai változásokra való gyors, hatékony válaszreakciót.

Név	Rendszertani besorolás	Hidrogenázok száma
<i>Thiocapsa roseopersicina</i>	γ -Proteobaktérium	4
<i>Escherichia coli</i>	γ -Proteobaktérium	4
<i>Methanococcus voltae</i>	Euryarchaeota	4
<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	γ -Proteobaktérium	3
<i>Ralstonia eutropha</i>	β -Proteobaktérium	3
<i>Trichomonas vaginalis</i>	Eukarióta	2
<i>Azotobacter vinelandii</i>	γ -Proteobaktérium	1

1. Táblázat. A hidrogenázok számszerű előfordulása különböző mikroorganizmusokban (14).

A hidrogenázokat csoportosíthatjuk az általuk katalizált reakció *in vivo* vagy *in vitro* preferált iránya szerint. *In vitro* valamennyi ismert hidrogenáz képes mind a kétirányú reakciót katalizálni, *in vivo* azonban az egyik vagy a másik irányt részesítik előnyben a szubsztáttermék egyensúlynak megfelelően (87). Az irodalomban a hidrogénfelvevő irányban működő hidrogenázokat az uptake, a hidrogénfejlesztést katalizáló enzimeket pedig az evolution jelzővel illetik. A hidrogenázok expressziója lehet konstitutív vagy indukálható (16). Az indukálást a légtérbe juttatott hidrogénnel vagy a nitrogénáz enzim aktivitásának indukálásával lehet biztosítani. *In vitro* a hidrogenázok többsége oxigén érzékeny. A legtöbb baktérium anaerob vagy mikroaerofil körülményeket igényel a hidrogenáz expresszióhoz (4).

A kezdeti szakirodalmi közlemények a különböző mikroorganizmusok fiziológiájára (1) összpontosítottak. Mára a molekuláris biológia és a genetika térhódítása figyelhető meg a hidrogenáz kutatás terén is, a biológia tudomány egyéb területeihez hasonlóan.

A hidrogenázok többsége fém tartalmú enzim. Minden hidrogenáz tartalmaz FeS kockákat a legkülönbözőbb elrendeződésben. Az egyik ezek közül a klasszikus [2Fe-2S], [3Fe-4S] és a [4Fe-4S] vas-kén kockákba való rendeződés (81). A vas-kén kockák általános tulajdonságai nagyon jól, bioszintézisük azonban még nem ismert, ezért a hidrogenáz kutatás e területén intenzív kutatások folynak.

A fém klaszterek másik típusa képezi a hidrogenázok aktív régióját. Ez alapján a hidrogenázok két csoportra oszthatók. Fémként, nikkelt és vasat (82) és fémként kizárólag vasat tartalmazó (58) aktív centrumok ismertek. A kristályszerkezet meghatározásával néhány [NiFe] és [Fe] hidrogenáz aktív centruma már ismertté vált (pl.: *Desulfovibrio gigas*).

A meghatározott szekvencia adatok alapján a hidrogenázok rokonságban állnak egyéb redox fehérjékkel és enzimekkel. A Fe-S kockák, valamint az aktív centrumuk révén a hidrogenázok homológiát mutatnak a szolubilis ferredoxinokkal és egyes légzési lánchoz tartozó komplexekkel, mint például a NADH-ubiquinon oxidoreduktázzal (Komplex I) (60).

1.6.1. Hidrogenáz aktivitás a metanotróf baktériumokban

A metanotrófok hidrogén anyagcseréjéről nagyon kevés ismeret áll rendelkezésre. *Methylobacterium album* BG8-ből és *Methylosinus trichosporium* OB3b-ből anaerob

körülmények között sikerült kimutatni konstitutív hidrogénfejlesztő aktivitást (42). A maximális aktivitás 1,5 és 0,45 nmol H₂ fejlesztés (perc x mg fehérje)⁻¹ sejtszárazanyag volt. Takeda (78) kimutatta, hogy a *Methylocystis* T-1 nitrogénfixáló körülmények között fejlesztett hidrogént abban az esetben, ha a gáztér 1,5-5,0% O₂-t tartalmazott. Ennél magasabb oxigénkoncentráció a nitrogénfixálást gátolta, s akkor sem tapasztaltak hidrogénfejlődést, ha az oxigénkoncentrációt 1,5% alá csökkentették. Ebben az esetben a hidrogént a hipotézis szerint a nitrogenáz enzim termelte. Chen és Yoch (1987) külön konstitutív és indukálható hidrogenáz aktivitást mutatott ki *M. trichosporium* OB3b-ban (16).

A *Methylosinus trichosporium* OB3b-ban talált hidrogén felvevő hidrogenáz aktivitás képes redukáló erőforrást szolgáltatni az sMMO és a pMMO számára is (74).

1.6.2. A hidrogenázok három filogenetikailag különböző osztálya

Az első izolált és jellemzett hidrogenázok vas-kén tartalmú dimer fehérjék voltak. Elsősorban obligát anaerob szervezetekben találhatók meg, mint pl. *D. vulgaris* (83) és a *Clostridium pasteurianum* (49). Az osztályozás elsősorban a specifikus elektron donorok és akceptorok - mint a NAD⁺, citokrómok, koenzim - F₄₂₀ vagy ferredoxin- révén történt.

Jelenleg már több mint 100 hidrogenáz szekvencia hozzáférhető, ebből több mint 40 mikroorganizmus genom-szekvenciája ismert. A rendelkezésre álló adatok alapján a növekvő diverzitás (méret, negyedleges szerkezet, elektron donorok és akceptorok minősége) ellenére a hidrogenázokat három filogenetikai osztályba sorolják. Ezek a [Fe], [NiFe] és a fémet nem tartalmazó hidrogenázok (81). Mindegyikre jellemző egy erősen konzervált funkcionális mag (csoport) megléte. A magot alegységek vagy domének alkotják, melyek a katalitikus régió részét képezik és a megfelelő struktúra és funkció kialakulásának nélkülözhetetlen „kellékei”.

1.6.2.1. [NiFe] hidrogenázok

A Proteobaktériumokban periplazmatikus ill. membránban található [NiFe] hidrogenázok többsége két alegységből álló heterodimert képez. A nagy alegység tartalmazza az aktív centrumot. A kis alegységben két-három vas-kén (Fe-S) centrum található. A centrumok vesznek részt az elektronok továbbításában az aktív centrum és a fiziológiai elektron akceptorok/donorok között. A [NiFe] hidrogenázokban [4Fe-4S] és [3Fe-4S] kockák biztosítják az elektronok áramlását az aktív centrumról a funkcionális partner felé, ami pl. citokróm lehet (82).

Az aktív centrum (NiFe (CN)₂ (CO)) szerkezetet mutat. A CO és a két cianid ligand a vas atomhoz kapcsolódik. Az aktív centrum 2x2, az N- és C-terminálison található CxxC motívumon keresztül kapcsolódik a nagy alegységhez.

A [NiFe] hidrogenázok egyik alcsoportját alkotják a nikkelen és vason kívül egy harmadik típusú fémet, a szelént is tartalmazó [NiFeSe] hidrogenázok. A szelén szelenociszteinként a nikkellel koordinálódva helyezkedik el az enzimben (30).

1.6.2.2. [Fe] tartalmú hidrogenázok

A [NiFe] tartalmú hidrogenázokhoz hasonlóan többnyire heterodimert alkotnak. Ez alól kivételt képez a közelmúltban *Thermotoga maritima* (80) baktériumban talált három alegységes NADH oxidáló hidrogenáz. A két alegységes [Fe] hidrogenázok [4Fe-4S] klaszterei a nagy alegységen találhatóak. Ismertek egy alegységes [Fe] hidrogenázok, ezek [2Fe-2S] és [4Fe-4S] centrumokat is tartalmaznak.

A különleges felépítésű aktív centrum, amely fémként kizárólag vasat tartalmaz, szintén a nagy alegységen található.

1.6.2.3. Fémet nem tartalmazó hidrogenázok

A hidrogenázok egy különleges csoportját képezi a metanogéneknél felfedezett, fémet nem tartalmazó hidrogenáz. Hidrogenáz aktivitás kizárólag akkor detektálható, ha egy specifikus

redox partner, az N^5 , N^{10} - metenil-tetrahydro-metanopterin (metenil- H_4MPT^+) kapcsolódik össze az enzimmal (52)

Az enzim egy monocisztronos génen kódolt homodimer, a hidrogén termelő metilén tetrahydro-metanopterin dehidrogenáz (Hmd) (89). A Hmd a metenil- H_4MPT^+ H_2 -nel való redukcióját katalizálja N^5 , N^{10} -metilén tetrahydro-metanopterinné (metilén- H_4MPT). A Hmd ezen kívül az F_{420} -függő metilén tetrahydro-metanopterin dehidrogenázzal (Mtd) együtt az F_{420} H_2 -nel való redukcióját katalizálja (63). Mind a két enzim nikkel mentes körülmények között indukálható. Az aktivitást nem lehet gátolni sem CO, sem NO vagy C_2H_2 kezeléssel. Ezek a vegyületek a legtöbb [NiFe] és [Fe] tartalmú hidrogenázra gátló hatást fejtenek ki (81). A fémet nem tartalmazó hidrogenázok tehát alapvetően különböznek a fémtartalmú hidrogenázoktól. A közelmúltban sikerült kimutatni, hogy a fémet nem tartalmazó hidrogenázok tartalmaznak egy szerves kofaktort (13).

1.6.3. Származástani kapcsolatok

A származástani osztályok megállapításában nagy segítséget jelent a röntgen krisztallográfia, legalábbis a [Fe] és [NiFe] hidrogenázok esetében. A két fémet tartalmazó osztályba tartozó hidrogenázok aktív centrumai meglepő szerkezeti hasonlóságot mutatnak, annak ellenére, hogy az ezt körülvevő polipeptid elrendezésben alapvetően különböznek. A háromdimenziós kristályszerkezetek alapján megállapították, hogy nincs származástani kapcsolat a [NiFe] és [Fe] tartalmú hidrogenázok között (87).

Ezt tekinthetjük a konvergens fejlődés jól alátámasztott esetének. A szekvencia adatok alapján valószínűsíthető, hogy a fémet nem tartalmazó hidrogenázok szerkezeti felépítése eltér a két, fémet tartalmazó hidrogenázokétól (81).

1.6.4. Sejtbeli lokalizáció

A hidrogenáz enzimek elhelyezkedése a sejtben lehet citoplazmatikus, periplazmatikus, valamint citoplazma vagy tilakoid membránhoz kötött. Eukariótákban pedig hidrogenozómákban lokalizáltak.

A periplazmában, vagy membránban elhelyezkedő [NiFe (Se)] hidrogenázok többsége a kis alegység N-terminálisán tartalmaz egy ún. szignál szekvenciát, ami a fehérje membránon keresztüli transzportjéért felelős. Ez a szekvencia tartalmaz egy konszenzus „twin-arginin” motívumot, ami egyéb periplazmatikus fémtartalmú enzimek „exportjéért” is felelős. A membránkötött hidrogenázok érésének záró lépéseként a kb. 50 aminosavat tartalmazó „leader” szekvencia a transzport végén levágódik.

1.6.5. Hidrogenáz gének

Az összetett aktív centrum bioszintéziséhez illetve a bioszintézis regulációjához számos kisegítő fehérjére van szükség.

A hidrogenázok bioszintézisét legalaposabban a hidrogénfelvevő (uptake) hidrogenázt tartalmazó Proteobaktériumokban tanulmányozták, ahol a hidrogenáz gének lehetnek kromoszómálisak vagy megaplazmidon helyezkednek el. A hidrogenázt kódoló operonokban a gének transzkripciós egységeket alkotva elhelyezkedők. Az alegységeket kódoló struktúr géneket 3' vagy 5' irányban követi az érésben és szabályozásban résztvevő fehérjéket kódoló kisegítő gének egy része. Az utóbbi tíz évben számos mutációs analízist hajtottak végre különböző mikroorganizmusok (pl.: *E. coli*, *R. eutropha*, *R. capsulatus*, *R. leguminosarum*, *B. japonicum*, *A. vinelandii* és *A. chroococcum*, *T. roseopersicina*) hidrogenáz operonjaiban (46) (22) (Maróti G. et. al. közlés alatt). Az érésben résztvevő géneket két csoportba sorolják. Az első csoportba tartozó gének a struktúrgénekkal transzkripciós egységet képezve helyezkednek el a genomban (*cisz* gének) és kizárólag az azonos operonban elhelyezkedő struktúrgének által kódolt hidrogenázok érésében vesznek részt. Az érésben résztvevő fehérjéket kódoló *hyp* (hydrogenase pleiotropic genes) géncsaládra (*transz* gének) pedig az jellemző, hogy a géntermékek pleiotrópikusak, az összes hidrogenáz érésére hatással vannak. Az *E. coli* genomban található *hypABCDE* operon mind a három aktív izoenzim érésére hatással van (45). A hatodik *hyp* gén, a *hypF* máshol helyezkedik el a kromoszómán (41). Van

azonban két kivétel: a HypA, ami kizárólag a 3. hidrogenáz érésében vesz részt és a HypC, amely nem vesz részt a 2. hidrogenáz érési folyamataiban.

Hasonló géneket azonosítottak aerob hidrogénoxidáló baktériumokban is (28). *R. eutropha* hyp operon egy része (*hypACDEFX*) két példányban van jelen. Mindkét operon mutációja szükséges a hidrogenáz mínusz mutáns fenotípus létrehozásához.

1.6.6. Szolubilis hidrogenázok

A dolgozatban bemutatásra kerülő saját eredmények miatt lényeges a NAD^+ -redukáló multimer hidrogenázok részletes jellemzésére külön kitérni. Elsőként *Ralstonia eutropha* Gram (-), β -proteobaktériumból izoláltak szolubilis, négy alegységes, hidrogenázt, amely képes a NAD^+ -ot hidrogénnel reverzibilisen redukálni (71). A NAD(P)^+ -függő hidrogenázok általában heterotetramer elrendeződésű, komplex enzimek, 175 kDa átlagos molekulatömeeggel. A tetramert egy diaforáz és egy hidrogenáz dimer alkotja. A hidrogenáz dimer végzi a molekuláris hidrogén oxidálását, illetve a hidrogéntermelést. A diaforáz dimer felelős a redukált kofaktor (NAD(P)H) oxidálásáért, illetve NAD(P)H képzésért [4. Ábra, 27. oldal]. A diaforáz dimer nagy alegysége (HoxF) tartalmaz NAD^+ -ot, FMN-t és 2 [Fe-S] kockát. A tetramert alkotó másik dimer egy, a *hoxY* és *hoxH* gének által kódolt [NiFe] hidrogenáz (79). A struktúrgének plazmidon helyezkednek el. Irányított mutagenézis segítségével, *in vitro* létrehozták a két dimert, és kísérletesen igazolták, hogy a két dimer egymástól függetlenül működik, valamint a diaforáz alegységnek szerepe van az enzim stabilizálás kialakításában (48).

Egyedüli hidrogenáz enzimeként fordul elő a Gram (+) baktériumok közül a *Nocardia opaca*-ban (*Rhodococcus opacus* MR22) (36). A struktúrgének két nyitott leolvasási kerettel együtt, illetve a *hoxH* hidrogenáz dimer nagy alegységét kódoló fehérjétől 3' irányban egy *hoxW* proteázt kódoló génnel együtt plazmidon lokalizáltak. A stop és start kodonok *R. eutropha* *hoxFUY* struktúrgénjeihez hasonlóan, szintén átfednek. A struktúrgének magas fehérjeszintű azonosságot mutatnak *R. eutropha* struktúrgénjeivel (HoxF: 89,9%, HoxU: 92,3, HoxY: 91,4, HoxH: 93,7). A két baktérium szolubilis hidrogenáz struktúrgéneket kódoló nukleotid szekvenciája 84%-os azonosságot mutat. A polipeptid lánc másodlagos szerkezetében, a hidrofób, hidrofil régiók előfordulásában sincs szignifikáns különbség. Az alegységek molekulamérete páronként szinte teljesen azonos. A közelmúltban sikerült *Rh. opacus* MR11 törzsből származó, funkcionálisan aktív NAD^+ -redukáló hidrogenázt *R. eutropha* H16 szolubilis hidrogenáz mutáns törzsből expresszálni (61).

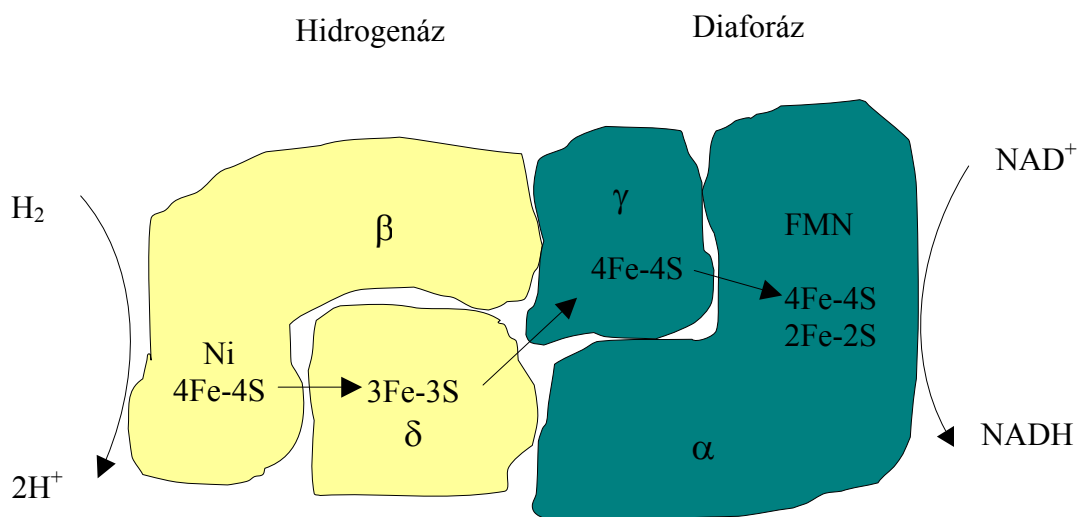
NADP-függő [Fe] tartalmú hidrogenázt kódoló struktúrgéneket (*hndABCD*) klónoztak, szekvenáltak *Desulfovibrio fructosovorans* szulfátredukáló baktériumban (47). A *hndA* által kódolt fehérje N-terminálisa (149 aminosav) alacsony, 26%-os azonosságot mutat a *R. eutropha* HoxF NAD⁺-redukáló hidrogenáz alegységével. A 13,8 kDa-os, *hndB* gének által kódolt fehérje alegység nem mutat homológiát egyik ismert NAD(P)⁺-függő hidrogenázzal sem. A HndC 59%-os azonosságot mutat *Anabaena variabilis* HoxF alegységével, a HndD pedig 34%-osat a HoxU alegységgel.

A cianobaktériumok reverzibilis hidrogenáza mindkét irányban katalizál. Konstitutívan fejeződik ki (73). A NAD(P)-redukáló hidrogenázok előfordulnak többek között *A. variabilis*-ban is. Erre a szolubilis NAD⁺-függő hidrogenázra jellemző, hogy legmagasabb szintű homológiát *R. eutropha* és *R. opacus* hidrogenázaival mutat a szintén négy alegységes enzim. A *hoxY* és a *hoxH*, valamint a *hoxU* és a *hoxF* struktúrgént kódoló alegységek között azonban nyitott leolvasási kereteket találunk. Ezen kívül a *hoxF*-et és a *hoxU*-t egy kb. 1 kb-nyi szekvencia választja el. Az enzimek tetramert vagy pentamert (70) képeznek és szolubilisak vagy lazán kapcsolódnak a membránhoz (81). Ötödik, HoxE alegységet először a *Synechocystis* sp. PCC 6803 törzsben írtak le. Feltételezések szerint ez harmadik diaforáz alegységként funkcionálhat (70). Csoportunkban, *Thiocapsa roseopersicina* bíborkén baktérium genomjában is megtalálták az ötödik alegységet kódoló gént (Rákhely et al., közlés alatt).

A *hoxU* és *hoxF* a diaforáz dimer kis és nagy alegységét kódoló gének (*R. eutropha*, *R. opacus* MR11 és *Anabaena variabilis* esetén is) homológiát mutatnak a Komplex I két alegységével. A Komplex I elsősorban mitokondrium belső membránjában, valamint baktérium citoplazma membránjában található NADH-ubiquinon oxidoreduktáz (88).

Pyrococcus furiosus hipertermofil archeában írták le az első több alegységes, szolubilis hidrogenázt (11). Az archaeák NAD(P)⁺-redukáló hidrogenázai szintén négy alegységesek. Az alegységek és a prosztetikus csoportok szerveződése hasonló az eubaktériumokban (pl.: *R. eutropha*) leírtakéhoz. A négy alegységes, tisztított és biokémiaileg jellemzett hidrogenáz feladata a H₂S vagy a H₂ termelése a mikroorganizmus fermentatív metabolizmusa során (62).

Megfelelő - oxigén jelenlétében vagy oxigénmentes- körülmények között a szolubilizált és a felsorolt szolubilis enzimek tisztíthatók a már ismert fehérjetisztítási módszerek segítségével. Az szolubilis enzimek általában nagy méretűek és savas aminosav oldalláncokat tartalmaznak, ezért tisztításuk során elsősorban gélfiltrációt vagy ioncserés kromatográfiát alkalmaznak.



4. Ábra. *Ralstonia eutropha* NAD⁺-redukáló hidrogenáz strukturális és funkcionális modellje.

1.6.7. Hidrogenázok fiziológiai szerepe

Legalább 13 hidrogenázokhoz rendelhető fiziológiai funkciót tudunk megkülönböztetni [2. Táblázat]. Közvetve vagy közvetlenül, többnyire a sejt energia átalakítási folyamataiban vesznek részt:

Csoportosítás	Funkció	Előfordulás
Kizárólag vasat tartalmazó (Fe-only) hidrogenázok	Fermentáció, energiakonzerválás?	Obligát anaerob baktériumok és Eukarióták
[NiFe (Se)] membránkötött vagy periplazmatikus/respiratórikus hidrogenázok	Energiakonzerválás	Anaerob, fakultatív anaerob, obligát anaerob és anaerob organizmusok Proteobaktériumok
[NiFe] (tilakoid) hidrogén felvevő hidrogenázok	Energiakonzerválás	Cianobaktériumok
Reverzibilis NAD(P)-függő hidrogenázok	Energiakonzerválás Redox-egyensúly	Cianobaktériumok

Csoportosítás	Funkció	Előfordulás
NAD(P)-függő hidrogenázok	Energiakonzerválás	Fakultatív és obligát anaerob baktériumok
NAD(P)-függő hidrogenázok	Fermentáció	Obligát anaerob Archeák
F ₄₂₀ -nem-reaktív hidrogenázok	Energiakonzerválás	Metanogének
F ₄₂₀ - reaktív hidrogenázok	Energiakonzerválás	Metanogének
[NiFe] szenzor hidrogenázok	Hidrogén-érzékelő komponens a hidrogenáz expresszió genetikai szabályzásában	Kemolitotróf/fototróf Proteobaktériumok
Formát-hidrogenliáz komplexhez asszociáltan előforduló [NiFe] hidrogenázok	Fermentáció	Fakultatív és obligát anaerobok, Archaeák
Ech hidrogenázok	Metanogenezis útvonal	Metanogének
Nem-fém hidrogenázok	Energiakonzerválás	Metanogének
Szolubilis-hidrogenázok	Nem ismert	<i>Anabaena cylindrica</i>

2. Táblázat: Hidrogenázok csoportosítása előfordulás és funkció alapján (14).

Az anaerob baktériumok metabolizmusában a hidrogenázok jelentőségét két esetben emelhetjük ki.

- a) Vannak közöttük fermentatív baktériumok, melyek hidrogén termelése a fermentáció során előállított redukált molekulák eloxidálása révén valósul meg (ezáltal biztosítva van az elektronhordozók folyamatos cirkulációja). Ezeknél a fermentatív anaerob mikroorganizmusoknál a fermentáció során a redox egyensúly úgy tartható fent, hogy az elektronok a redukált elektronhordozó faktorokról, a hidrogenázokon keresztül, hidrogénre, mint terminális elektron akceptorra kerülnek át. A *C. pasteurianum* hidrogenáza volt az első, tisztított és jellemzett enzim (15).

b) Számos anaerob baktérium képes a hidrogént, mint energiaforrást hasznosítani elektron akceptorok redukálásán keresztül [3. Táblázat].

Elektron akceptor	Reakció	Faj
Szulfát	$4\text{H}_2 + \text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{S}^{2-} + 4\text{H}_2\text{O}$	<i>Desulfovibrio sp.</i>
Szén-dioxid	$4\text{H}_2 + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$	<i>Methanobacterium sp.</i>
Szén-dioxid	$4\text{H}_2 + 2\text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_3\text{COOH} + 2\text{H}_2\text{O}$	<i>Acetobacterium sp.</i>
Kén	$\text{H}_2 + \text{S}^0 \rightarrow \text{H}_2\text{S}$	<i>Campylobacter sp.</i>
Nitrát	$5\text{H}_2 + 2\text{NO}_3^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{N}_2 + 6\text{H}_2\text{O}$	<i>Paracoccus denitrificans</i>
Fumársav	Fumársav + $\text{H}_2 \rightarrow$ borostyánkősav	<i>Vibrio succinogenesis</i>

3. Táblázat. A hidrogén anaerob viszonyok közötti energiaforrásként való hasznosítása (1).

A *Desulfovibrio* genusba tartozó fajok jellegzetessége a szulfát, komplex elektrontranszport lánc terminális elektron akceptoraként való felhasználása. A baktérium a szerves vegyületeket vagy hidrogént használja kiindulási elektron donorként, végül a folyamat H_2S fejlődéshez vezet. A H_2 hidrogenáz enzimen keresztül lép be az elektrontranszport láncba, egy alacsony redox potenciállal rendelkező citokróm c_3 -at redukálva, ami a következő lépésben ferredoxint redukál.

A metanogének egyedi csoportot képeznek az obligát anaerob mikroorganizmusok között. A hidrogént felhasználhatják egyedüli energiaforrásként a disszimilatórikus metántermelésnél és a széndioxid asszimilációja során, amikor a szenet beépítik a sejtjeikbe.

A *Paracoccus denitrificans*, amit habár aerob hidrogén-oxidáló baktériumként definiáltak, oxigént vagy nitrátot használ a respiratórikus hidrogénoxidáció során.

Fakultatív anaerob baktériumokban, mint pl. az *E. coli*, a piruvátot először formáttá oxidálja a piruvát-formát liáz enzim, acetyl-CoA képződésével, az energia ATP formájában raktározódik. Aerob körülmények között a piruvát-formát liázt a piruvát dehidrogenáz enzim váltja fel. Anaerob körülmények között, és amikor nincs megfelelő elektron akceptor a rendszerben, a formát hidrogénné és széndioxiddá oxidálódik. Az oxidációt a formát-

hidrogenliáz komplex végzi [17. oldal]. Az enzimkomplex működését a nitrát és az oxigén is gátolja.

Az *E. coli* képes a hidrogént, mint elektron donort hasznosítani. A baktérium növeszthető fumaráton vagy maláton, ha hidrogén vagy formát van jelen elektron donorként a rendszerben. A hidrogenáz a hidrogén elektronjait használva, egy citokróm b-n és menaquinonon keresztül végzi a fumarát redukcióját.

A fotoszintetizáló baktériumok a széndioxid fixáláshoz szükséges redukáló erőt szerves vagy szervetlen forrásokból nyerik. Hidrogént, kénhidrogént, elemi kén és egyes esetekben szerves vegyületeket használnak redukálószerként. Hidrogéntermelést kizárólag ammónia hiányában mérték, ezért a nitrogénfixálással hozták kapcsolatba. A termelődt hidrogén a nitrogenáz enzimkomplex működéséből származó melléktermék [17. oldal].

Egyes fajok képesek autotróf növekedésre a széndioxidot, mint szénforrást és a hidrogént, mint energiaforrást hasznosítva.

Az aerob hidrogén-oxidáló baktériumok jellegzetessége, hogy a hidrogént, mint elektron donort, a széndioxidot, mint szénforrást hasznosítva autotróf módon növekednek. Knallgas baktériumoknak is nevezik őket, mivel a terminális oxidálószer maga az oxigén molekula. Az aerob hidrogén baktériumok csoportja taxonómiaiilag meglehetősen heterogén. Gram-negatív képviselőik, pl.: *Ralstonia*, *Pseudomonas*, *Paracoccus*, *Xanthobacter*, Gram-pozitívok a *Nocardia*, *Mycobacterium* és *Bacillus* nemzetségek. A mikroorganizmusokban két tipikus hidrogenáz különíthető el. A szolubilis, amely hidrogénnel közvetlenül NAD^+ -ot redukál, és a membránkötött, amely nem képes a NAD^+ -dal közvetlenül reakcióba lépni. Az autotróf növekedés során a szolubilis hidrogenáz NADH -t termel a széndioxid fixáláshoz, mialatt a membránkötött hidrogenáz a respiratórikus láncon keresztül energiatermelésben vesz részt.

Aerob nitrogénfixáló baktériumokban (pl. *Azotobacter sp.*) a hidrogenáz enzimek fiziológiai szerepe a nitrogénfixáláshoz kapcsolódik. A nitrogén redukciója ammóniává egy meglehetősen energiaigényes folyamat, különösen akkor, ha az ATP-függő reakció során az elektronok jelentős része protonok redukciójára használódik fel. A nitrogénfixálók rendszerint tartalmaznak hidrogénfelvevő irányban működő (uptake) hidrogenázt. A nitrogenáz enzim által melléktermékként termelt hidrogént a hidrogenáz enzim oxidálja. Az elektronok visszajutnak a sejtbe, az így keletkező membránpotenciál különbség pedig az ATP-ázon keresztül egyenlítődik ki ATP keletkezés közben [5. Ábra, 32. oldal].

Néhány proteobaktériumban (*R. eutropha*, *R. capsulatus*, *B. leguminosarum*) a hidrogenázok expressziójának szabályzásában résztvevő szenzor funkciót ellátó hidrogenázokat találtak (8, 23).

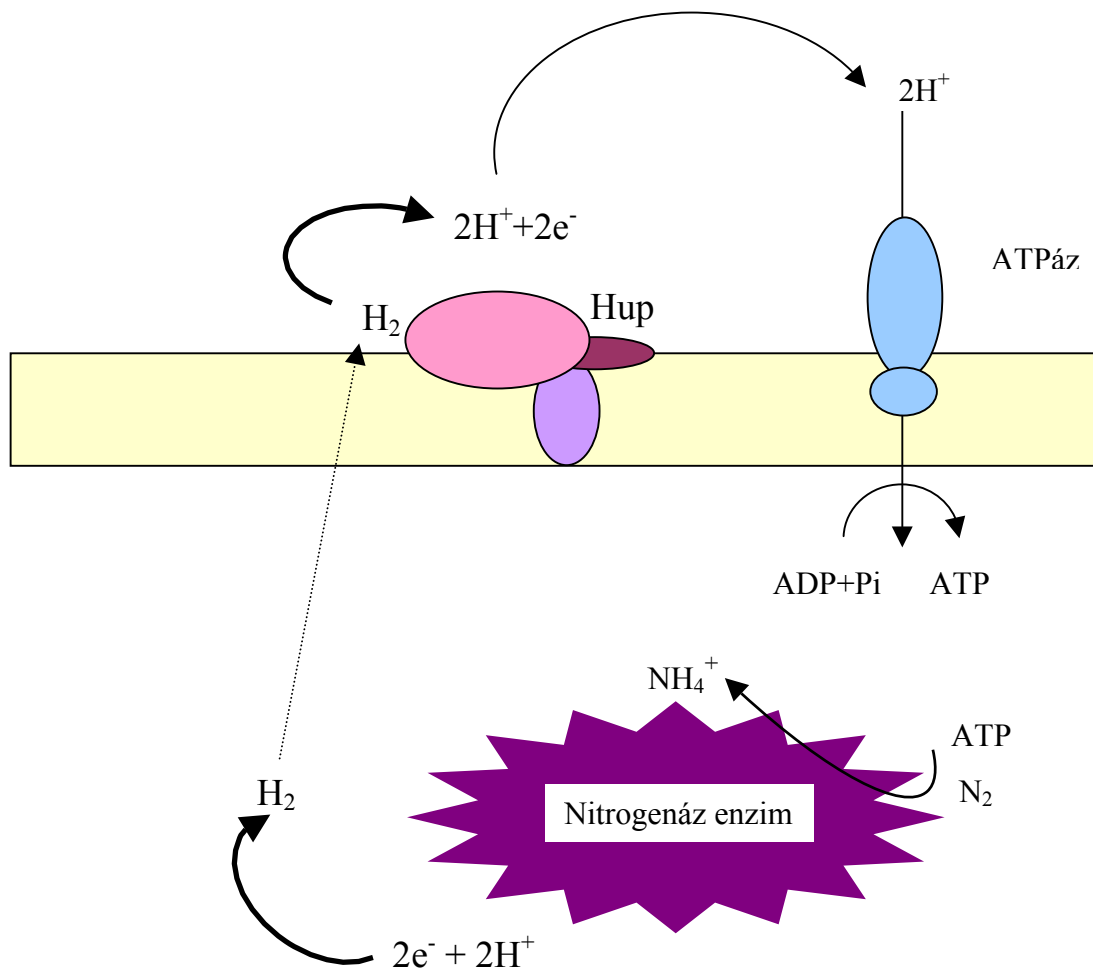
A cianobaktériumok hidrogén metabolizmusa jól tanulmányozott. Ezek a mikroorganizmusok, fajtól és növesztési körülményektől függően hidrogént termelnek vagy oxidálnak. A hidrogén szinte mindig csak a nitrogénfixálást végző sejtekben termelődik és a hidrogéntermelés, valamint a nitrogénfixálás egyaránt visszaesik, ha nitrogénforrást kap a baktérium. Mivel a nitrogénáz által történő hidrogéntermelés irreverzibilis, az összes ismert hidrogénoxidáló folyamat hidrogenáz által katalizált reakció.

A sejtben, a két irányban működő hidrogenázok a fotoszintetikus és respiratórikus transzport lánc redox egyensúlyát tartják fenn.

A hidrogenáz katalizál *in vivo* hidrogénfejlesztést, jóllehet nagyon speciális reakciókban. Egy példa erre az *Oscillatoria limnetica*, melynek intakt sejtjei hidrogént fejlesztenek szulfid- és fény-függő reakcióban.

Az eukarióták közül a zöld és barna algák különböző fajtái képesek a hidrogéntermelésre és a hidrogén gáz oxidálására is adott növesztési körülmények között (43). Mivel ezekben az eukariótákban nincs nitrogénáz enzim, a hidrogén metabolizmus az algákban kizárólag a hidrogenáz enzimeken keresztül valósul meg. A hidrogénhasznosítást algákban két csoportra, fény-függő és fénytől független reakciókra osztják. A fény-függő reakciók sokkal jobban tanulmányozottak, ami érthető, ha a rendszert, mint potenciális napenergia-átalakító rendszert tekintjük.

A protozoa Trichomonasok nem tartalmazznak mitokondriumot vagy peroxiszómát, de található bennük egy jellegzetes, membránkötött szervecske, amit hidrogenoszómának neveznek. Fő funkciója a piruvát anaerob úton történő átalakítása acetáttá, amit - hasonlóan az anaerob baktériumokhoz - szubsztrát szintű foszforiláció és hidrogéntermelés kísér. Aerob körülmények között a hidrogenoszómák a piruvát metabolizmusa során molekuláris oxigént használnak terminális elektronakceptorként.



5. Ábra. A membránkött [NiFe] hidrogenázok baktériumok energiaháztartásában betöltött szerepe.

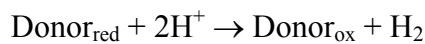
1.6.8. Hidrogenáz aktivitásmérés

1.6.8.1. Aktivitásmérési technikák (14)

A hidrogenáz enzimek eddig ismert elsődleges elektronszállítói a ferredoxin, flavodoxin, citokróm c_3 és a NAD. Számos mesterséges elektronhordozó vegyület (pl.: redox festékek) ismert, melyek segítségével a rutin enzimaktivitási méréseket végzik.

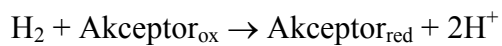
A hidrogenáz aktivitás mérési módszerek az alábbi reakciók katalízisén alapulnak:

Hidrogéntermelés:



ahol az elektron donor egy alacsony redox potenciálú vegyület, mint a citokróm c_3 (*D. gigas*) ($E_0' = -330$ mV) vagy a metilviologén ($E_0' = -446$ mV).

Hidrogén oxidáció:



ahol az elektron akceptor lehet általában a standard hidrogén elektród redox potenciáljánál ($E_0' = -420$ mV) magasabb redox potenciállal rendelkező vegyület, pl.: a metilénkék ($E_0' = +11$ mV), benzilviologén ($E_0' = -358$ mV) vagy a diklórfenol-indofenol (DCIP) ($E_0' = -217$ mV).

Habár a metilviologént alacsony redox potenciálja miatt elsősorban hidrogén fejlesztő aktivitásmérések elektrondonorjaként használják, számos hidrogenáz redukálja is a festéket hidrogén jelenlétében. Ennek az az oka, hogy a hidrogenáz által katalizált reakció egy egyensúlyi folyamat. *In vitro* tetszőleges irányban eltolható az egyensúly a szubsztrát vagy a termék túlsúlyával. Így abban az esetben, ha a redukált metilviologént túlsúlyban használjuk, a reakció eltolható hidrogén fejlesztés irányába.

A metilviologén és a metilénkék is elsődleges elektronhordozóként vesz részt a tiszta hidrogenáz preparátumokkal végzett aktivitásmérési reakciókban, nem tiszta enzimpreparátumok esetén, a természetesen jelenlévő elektronhordozók képesek lehetnek a

festék és az enzim közötti kapcsolat kialakítására. Ezért a részlegesen tisztított preparátumokban természetesen jelenlévő, hidrogenáz által redukálható szubsztrátok jelenléte hidrogén felvevő irányban, tehát a szubsztrát redukcióját nyomon követve, az aktivitás alulbecslését eredményezheti, viszont túlbecsléshez vezethet, ha a hidrogén mennyiségének csökkenését követjük nyomon.

Hiba forrása lehet még a reakcióedény geometriájából, pontosabban az általa kialakított folyadék-gáztér érintkezési felületének nagyságából adódó eltérés.

Ezek mellett az enzim koncentráció változtatásával az aktivitás változása nem egyenesen arányos, ami újabb szisztematikus hibához vezet (6). Ezért a különböző laborok specifikus hidrogenáz aktivitás értékeit nem hasonlíthatjuk össze.

A leggyakrabban alkalmazott mérési módszerek a következők:

1. A reakciót a donor oxidálásán vagy az akceptor redukálásán keresztül követjük, spektrofotometriásan mérve.
2. Amperometriásan, Clark-típusú elektródot használva. Ez egy gázáteresztő membránnal határolt platina elektród. A módszer előnye, hogy lehetővé teszi a hidrogéntermelés sebességének folyamatos követését.
3. Gáznyomást mérve, manometriásan. A gázfejlődést mérjük, ebből számolható az aktivitás.
4. Gázkromatográf segítségével, hővezetőképesség-mérő detektorral. Ebben az esetben a hidrogénfejlesztő aktivitást, a termelődött hidrogén gáz mennyiségi analízisével határozzuk meg.

Egy tényezőt azonban nem szabad figyelmen kívül hagyni, amely a felsorolt módszerek mindegyikénél fontos, hogy a hidrogén kijut a folyadék fázisból a folyadék feletti gáztérbe.

A harmadik és a negyedik módszerrel a hidrogén gáz, folyadék feletti gázfázisban lévő parciális nyomását lehet meghatározni. A módszerek azzal a kritériummal használhatók, ha feltételezzük, hogy a gáz és a folyadék fázis között egyensúly áll fenn és kevertetjük a rendszert. A gázmolekulák cseréjének mértéke a folyadék és a gázfázis között nagyon lassú, különösen alacsony hidrogén koncentráció esetén.

További aktivitás mérésére használt módszer, pl. a deutérium vagy trícium cserén alapuló technika, melynek előnye, hogy szárított enzimen (14) is lehet aktivitást mérni, valamint nincs szükség elektron donorra, illetve akceptorra. A deutériumot ebben az esetben

tömegspektrométerrel detektálják. A mérési módszer alternatív változata, amikor a víz hidrogén atomját tríciumra cserélik, ilyenkor radioaktivitást detektálva mérik az aktivitást.

1.6.8.2. Az oxigén szerepe (2)

Az oxigénnel, az enzimstabilitás és az enzimaktivitás mérés szempontjából is nagyon fontos foglalkoznunk. Az összes hidrogén felvevő aktivitást mérő technika esetén gondot jelenthet - akár nyomnyi mennyiségben jelenlevő- oxigén jelenléte. Hidrogenáz aktivitás oxigén jelenlétében nem mérhető, illetve mérési hibát okoz. A méréshez elengedhetetlen az oxigénmentes közeg fenntartása. Ezért a hidrogén felvevő aktivitás mérések során oxigénmentesítő rendszereket alkalmaznak, ilyen pl.: a glükóz/glükóz-oxidáz vagy a merkaptotanol/B-12 vitamin rendszer. A hidrogén fejlesztő aktivitás mérések során általában Na-ditionitot használnak az elektrondonorok elredukálására, ami, feleslegben alkalmazva, biztosítja a rendszer oxigén-mentesítését.

1.7. A hidrogén anyagcserével kapcsolatba hozható enzimek

Ismertek olyan enzimrendszerek, amelynél a hidrogén, mint reakciópartner jelen van, de az enzimek nem tekinthetők hidrogenáznak, mivel önmagukban nem képesek a hidrogén reverzibilis átalakítására.

A nitrogénáz enzimkomplex feladata az elemi nitrogén megkötése, redukciója ammóniává. Ezek az enzimek vas, szulfid alapú, komplex proszitetikus csoportokat tartalmaznak, molibdénnel vagy vanádiummal kombinálva. A nitrogénázok a nitrogén redukálásának melléktermékeként hidrogént termelnek (3) [5. Ábra, 32. oldal].

A formát-hidrogenáz komplexet elsősorban Enterobaktériumokban, főleg *E. coli*-ban tanulmányozták. A formát-hidrogenáz egy membránkött multienzim. Formát dehidrogenáz és hidrogenáz enzim kapcsolódik össze különböző elektron transzport molekulákon keresztül. A komplex membránkött, a membrán belső, citoplazma felőli oldalán helyezkedik el. Az enzim anaerob körülmények között, exogén elektron akceptor hiányában a hangyasavat széndioxidá és hidrogénné oxidálja. A komplexnek két különböző - formát dehidrogenáz és hidrogenáz - aktivitása van. *E. coli*-ban a formát dehidrogenáz fémként vasat és szelént

tartalmaz, az utóbbi szelenocisztein formában található az enzimben. Emellett egy molibdopterín kofaktort is azonosítottak (5). A komplex hidrogenáz enzime egy [NiFe] hidrogenáz. A hét alegység a *hycABCDEFGHI* operonban kódolt (67).

Egyes kemolitoautotróf baktériumok, mint pl. a *Pseudomonas carboxydovorans*, a szénmonoxidot (CO), mint kizárólagos szén-és energiaforrást hasznosítják aerob vagy denitrifikáló körülmények között (50). A metabolizmus fakultatív, legtöbb képviselőjük a szénmonoxidon kívül képes széndioxid, szerves szubsztrátok és hidrogén hasznosítására is. A CO és H₂ hasznosításához olyan enzimmészletre van szükség, amely egyedülálló összetételben található meg a mikroorganizmusokban. Ezek közül a CO oxidációt a molibdén tartalmazó vas-kén flavoprotein CO dehidrogenáz végzi. Ehhez kapcsolódik többek között egy membránkötött (uptake) hidrogenáz. A CO dehidrogenáz a CO széndioxiddá való oxidációját katalizálja víz jelenlétében. Az elektronok egy membránkötött citokrómra továbbítódnak. Tisztított enzimen mesterséges elektron akceptorokkal is mérhető CO dehidrogenáz aktivitás. Megfelelő mesterséges elektron akceptorokkal és donorokkal a tisztított enzimmal hidrogenáz aktivitást is mértek (52). Az aktivitás a CO oxidáló aktivitáshoz képest alacsony volt, annak átlagosan csupán 0,5%-át érte el.

2. Célkitűzések

2.1. Általános célkitűzés

A metán monooxigenáz enzimek egyedülálló katalitikus aktivitásuk révén számos környezetkímélő és gazdaságos biotechnológiai eljárás lehetséges katalizátorai [4. oldal]. *In vitro* működésükhöz azonban szükség van egy olcsó, környezetbarát redukáló erőforrásra. A hidrogenáz enzimek által termelt hidrogén egy ideális jelölt erre a célra. Ezért célul tűztem ki a metanotrófok hidrogén anyagcseréjének, a hidrogén metabolizmusban szerepet játszó enzimeknek a pontos megismerését, valamint a metán és hidrogén anyagcsere közötti molekuláris kapcsolat vizsgálatát.

2.2. Részletes célkitűzés

A fenti általános cél elérése érdekében a hidrogenáz enzimek tanulmányozását, elsősorban fehérje szintű jellemzését végeztem el az alábbi részfeladatok alapján:

- 1. A baktériumban található hidrogenáz enzimek kimutatása
- 2. Hidrogenáz aktivitásmérések optimalizálása *Methylococcus capsulatus* (Bath)-ban
- 3. Az enzimek lokalizációjának vizsgálata
- 4. A Hox típusú szolubilis hidrogenáz struktúrgénjeinek azonosítása
- 5. Membránkötött hidrogenáz struktúrgének térképezése metanotrófokban
- 6. A szolubilis hidrogenáz enzim biokémiai jellemzése
- 7. A hidrogenáz enzimek *in vivo* funkciójának meghatározása

A *Methylococcus capsulatus* (Bath) termofil metanotróf baktérium az egyik legalaposabban tanulmányozott metanotróf, ezért választottam munkám tárgyául.

3. Anyagok és módszerek

A kísérletekhez felhasznált vegyszerek nagy része a Sigma (USA), Reanal Vegyszergyár (Magyarország) és a Merck (Németország) cégek terméke.

3.1. Tápoldatok és táptalajok

NMS (nitrate mineral salt): 10mM KNO₃; 4mM MgSO₄·7H₂O; 1,36mM CaCl₂·2H₂O; 2mM KH₂PO₄; 2mM Na₂HPO₄; 3,3μM FeSO₄·6H₂O; 10μM Fe-EDTA; 1,4μM ZnSO₄·7H₂O; 0,1μM MnCl₂·4H₂O; 0,24μM H₃BO₃; 1μM NaMoO₄·2H₂O; 0,3μM CoCl₂·6H₂O; 0,67μM Na-EDTA (84).

A tápoldatot 2,1μM NiCl₂·6H₂O-val egészítettem ki. A réztartalmú tápoldatok/táptalajok 1μM rézszulfátot tartalmaztak.

LB: 5g NaCl, 5g élesztő kivonat, 10g Bacto tripton, (pH=7) 1 liter végtérfogatra számítva.

3.1.1. Folyadékkultúra

500ml térfogatú Erlenmeyer lombikban 60ml tápoldatba kb. kétkacsnyi, Petri-csészéről származó inokulumot oltottam. A Suba-Seal dugóval lezárt Erlenmeyer lombikokat rázatva (200-250rpm), 43°C-on tartottam. A 440ml gáztér összetétele 50%levegő, 48%metán és 2% széndioxid volt. A tápanyagul szolgáló gázkeveréket 1-2 naponta cseréltem.

Az *E. coli*-t 37°C-on LB folyadékban tartottam fenn (66).

3.1.2. Tenyésztés szilárd táptalajon

A metanotróf baktériumokat 1,5% Bacto agart tartalmazó NMS táptalajon tenyésztettem. A Petri-csészéket anaerosztátban tartottam, a folyadékkultúráknál leírt atmoszféra alatt. Az anaerosztátok gázterét 6-7 naponta cseréltem.

Az *E. coli*-t 37°C-on LB lemezen (1,5% agar) tartottam fenn (66).

3.2. Fermentorkultúra

1,5 liter kapacitású “BioFlo IIC” New Brunswick típusú fermentort használtam, 5 liter NMS tápoldattal. A tenyésztési körülmények folyamatos üzemmódban a következők voltak: 43°C, 150-250rpm állandó kevertetés, pH=6,8. A tenyészetet folyamatosan átbuborékolattam levegővel és CH₄-CO₂ keverékkel (áramlási sebesség ekkor levegő esetén 75ml/min, a CH₄-CO₂ keverék esetén 50ml/min volt).

3.3. Szolubilis és membrán frakció preparálása

Methylococcus capsulatus (Bath) sejteket 10000xg sebességen, 10 percig centrifugáltam, majd 20mM MOPS (pH=7,0) pufferben felszuszpendáltam. 0,25mg/ml lizozim hozzáadása után, 37°C-on, 10 percig inkubáltam. A sejteket ultraszonikátor segítségével tártam fel. A sejttörmelék eltávolítása (15000xg, 15 perc) után a sejtmentes frakciót (felülúszó) szétválasztottam szolubilis és membrán frakcióra (100000xg, 1 óra) (37). A membrán frakciót 25mM MOPS pufferben (pH=7,0) mostam, centrifugáltam (100000xg, 1 óra). Periplazmatikus frakciót tisztítottam (66) a szolubilis hidrogenáz lokalizációjának meghatározása céljából.

3.4. A pH függés meghatározásához használt pufferek

<i>pH</i>	<i>puffer</i>
4,0	Citrát-foszfát puffer
5,0	Citrát-foszfát puffer
6,0	Citrát-foszfát puffer
6,0	25mM MOPS
6,8	25mM MOPS
7,0	25mM MOPS
7,0	Citrát-foszfát puffer
7,2	50mM Tris-HCl
8,0	50mM Tris-HCl
9,0	50mM Tris-HCl

3.5. Hőkezelés

A szolubilis frakció hidrogenáz aktivitásának hőmérsékletfüggését a következő paraméterek szerint vizsgáltam. A mintát 10 percig inkubáltam az adott hőmérsékleten, levegőn és nitrogén gáztér alatt. Majd 5 perc, 10000xg centrifugálással távolítottam el a kezelés hatására kicsapódott fehérjét. Szignifikáns aktivitásvesztést nem tapasztaltam az oxigénezen kezelt minta esetén, ezért az oxigénezen való hőkezelést alkalmaztam.

3.6. Sejtek permeabilizálása detergenssel

60ml tápoldatba, 10%-nyi folyadék indító kultúrával leoltott, 43°C-on, stacioner fázisig nevelt, rázatott sejt kultúrával dolgoztam. A sejteket centrifugáltam (10 perc, 5000xg), majd 20mM K-PO₄ pufferben (pH=7,0) szuszpendáltam fel.

Triton X-100 nem ionos detergenst használtam a *Methylococcus capsulatus* (Bath) sejtek permeabilizálására. A sejteket a detergens hozzáadása után 37°C-on, 30 percig inkubáltam.

3.7. Fehérje meghatározás

A fehérjetartalmat a Lowry mérési módszeren alapuló DC (Bio-rad) fehérje-meghatározó rendszer segítségével mértem. Marha szérum albumint használtam standardként. A reakcióelegy 1-2mg szolubilis vagy, 0,8-1mg membrán fehérjét tartalmazott.

3.8. Hidrogenáz aktivitásmérés

3.8.1. Hidrogénfejlesztő aktivitásmérés

500ml-es Erlenmeyer lombikban 1 napig 43°C-on rázatva nevelt OD₅₄₀=1,8-2,0 baktérium kultúrával dolgoztam. A tenyészetet (15 perc, 4°C, 13000xg) lecentrifugáltam. A felülúszó leöntése után 50mM foszfát pufferben (pH=7,0) oldottam fel a baktériumokat úgy, hogy az OD₅₄₀=1 legyen. 2ml sejt szuszpenziót a megfelelő redox festékkel (metilviologén, benzilviologén, metilénkék, koncentráció: 0,8mM) 10ml-es reakcióedénybe helyeztem. A Na-formátot 25mM végkoncentrációban alkalmaztam. A reakcióedények gázbiztos lezárása után

a folyadék feletti gázteret N_2 -re cseréltem. A reakció 15mM Na-ditionit, illetve 1,2mM NADH hozzáadásával indult. A mintákat 20-30 percig 43°C -on rázatva inkubáltam. A gáztérből 500 μl -t analizáltam Hitachi 263-50 típusú hővezető képesség mérő detektoros gázkromatográfval. A gázkromatográf üzemeltetési paraméterei a következők voltak: $T_{\text{oszlop}}=T_{\text{detektor}}=T_{\text{injektor}}=120^\circ\text{C}$, érzékenység: 8, vivőgáz: N_2 ; $p(N_2)=50\text{ml/min.}$, 5Å molekulaszűrő töltet, 1,5mm átmérőjű 2m hosszú oszlopba töltve.

3.8.2. Hidrogén felvevő aktivitásmérés egész sejtekkel

Hidrogén atmoszférában, megfelelő elektron akceptor jelenlétében a reakció a hidrogén felvétel irányában zajlik le. Ekkor a hidrogén fogyását az alkalmazott elektron akceptor színváltozásán keresztül követtem nyomon Unicam UV/VIS-UV2 spektrofotométer segítségével. Elektron akceptorként metilénkék, metilviologént, benzilviologént és NAD^+ -ot használtam. Metilénkék esetén a színes oxidált akceptor eltűnését, metil- és benzilviologén, valamint NAD^+ esetén pedig a redukált színes forma megjelenését követtem. NAD^+ alkalmazásánál a sejteket előzetesen fel kellett tárn.

Erlenmeyer lombikban, késői exponenciális fázisig ($OD_{540}=1,8-2,0$) nevelt kultúrákkal dolgoztam. A következő elektron akceptorokat és hullámhosszokat alkalmaztam: NAD^+ és $NADP^+$, 340nm, metilénkék, benzilviologén és metilviologén, 600nm. A hidrogénfejlesztésnél használt koncentrációkkal dolgoztam. Ezt követően 5ml ösztérfogató, légmentesen zárható, 1cm fényúttal rendelkező küvettákba bemelegítettem 2-2ml sejtszuszpenziót, majd a Suba-Seal gumidugóval légmentesen lezárt küvettákat anaerobizáltam. A reakció elegyet (2ml) kiegészítettem 10mM glükózzal és 1U glükóz oxidázzal, a visszamaradt oxigénnyomok eltávolítása céljából. A küvetták gázterének adott százalékát hidrogén gázzal cseréltem, ezzel indult a reakció. A mérést 43°C -on végeztem. A színváltozást a Vision szoftver Rate mérési módszere segítségével, spektrofotométerrel követtem nyomon. A idő/abszorbanancia függvényében kapott exponenciális görbék valódi meredekségét, a negatív kontrollal kapott meredekséggel korrigálva kaptam meg. A meredekségekből a Beer-Lambert törvény alapján számítottam a hidrogén felvevő aktivitást. Az aktivitás hidrogén koncentráció-függését három független mérés átlagából számítottam. Minden egyes mérésnél a 100% hidrogén koncentrációnál mért aktivitáshoz normáltam az eredményeket, és az így kapott értékeket átlagoltam.

3.9. sMMO aktivitás detektálás

M. capsulatus törzseket a mérés előtt két nappal 500ml-es lombikokba mért, 60ml NMS folyékony tápoldatba 5-10 telepről leoltottam és egy éjszakát CH_4+CO_2 gázkeverék alatt 43°C -on inkubáltam. Másnap a metanotróf folyadék kultúrákat átoltottam 500ml-es lombikokba, 60ml NMS folyadék tápoldatba, 6 ml tenyésztettel beoltva. 43°C -on inkubáltam egy éjszakán át. Harmadnap a felnőtt kultúrákból 5-5ml-t, 1-1 steril szcintillációs küvettába pipettáztam át melyekbe előzőleg 2-3 naftalin kristályt helyeztem. A kultúrákhoz hozzámértem 20 μl 1M Na-formátot majd 43°C -on 30 percig inkubáltam. Az inkubációs idő lejártá után a sejteket és a fel nem oldódott naftalin kristályokat centrifugáltam és a tiszta felülúszókból 1-1ml-t egy tiszta küvettába pipettáztam. A keletkezett 1-naftol detektálására o-dianizidin 5mM-os oldatát használtam, melyből 10 μl -t kevertem 1ml felülúszóhoz. A keletkező színes termék mennyiségét a festék abszorpció maximumán, 530nm-en spektrofotométer segítségével követtem.

3.10. Hidrogén hajtott metán monooxigenáz (pMMO és sMMO) aktivitásmérés

Fermentorban vagy Erlenmeyer lombikban késői exponenciális fázisig nevelt kultúrát lecentrifugáltam (5000xg, 4°C , 20 min). A sejteket 5mM MgCl_2 -t tartalmazó 20mM K-PO_4 (pH=7,0) pufferben mostam, majd ugyanabban a pufferben felszuszpendáltam (OD_{540} =10-15). 12ml össztérfogatú Hypo-vial üvegekben redukáló erőforrás (10mM Na-formát vagy hidrogén) jelenlétében 1 ml sejtszuszpenziót inkubáltam 20°C -on, 10 percig, majd 43°C -on rázatva 20 percig, végül 3ml propilén hozzáadásával 43°C -on további 15 percig. Az epoxidációs reakciót a minták jégre helyezésével blokkoltam. A szuszpenzió centrifugálása (5000xg, 10 perc, 0°C) után a felülúszóból (5 μl) analizáltam a keletkező propilén-epoxidot SRI8610 típusú gázkromatográfjal, lángionizációs (FID) detektorral, $T_{\text{oszlop}}=160^\circ\text{C}$, $T_{\text{detektor}}=205^\circ\text{C}$, $T_{\text{injektor}}=110^\circ\text{C}$, Porapack Q töltetet tartalmazó oszlopon elválasztva.

3.11. Polakrilamid-gélelektroforézis (PAGE)

Natív gradiens gélelektroforézis:

A fehérjék elválasztási hatékonyságának növelése érdekében 5-15% (w/v) akrilamid/bisakrilamid gradiens gélt preparáltam (68).

SDS gradiens gélelektroforézis:

A detergens jelenlétében történő fehérje elválasztást Sambrook és munkatársai leírása alapján hajtottam végre (66).

3.12. Fehérjék gélben való detektálása

A fehérjék gélben való lokalizációját Coomassie blue festési technikával határoztam meg (66). 0,5µg/sáv fehérjemennyiség alatt ezüstoffestést használtam O'Connell és Stults leírása alapján (55).

3.13. Hidrogén felvevő aktivitás detektálása poliakrilamid fehérjégélben

Az adott frakciók (szolubilis vagy részlegesen tisztított) natív gradiens gélen történő elektroforézise után a gélt 1mM benzilviologént tartalmazó 20mM K-foszfát pufferbe (pH=7,0) helyeztem és 43°C-on, N₂ gáztér alatt 10 percig inkubáltam. A gázteret H₂-re cseréltem, amit további 30 perc inkubáció követett. A reakció sebességének növelése érdekében Na-ditionittal elredukáltam a benzilviologén egy részét, a tartós kék szín eléréséig. Az enzim lokalizációját és az enzimaktivitást a gélben, benzilviologén adott fehérjesávban látható elredukálása (kék szín megjelenése) révén detektálható. A redukált benzilviologén oxigéneken elszíntelenedik, ezért trifenil-tetrazólium-klorid hozzáadásával fixáltam a redukált benzilviologént, amely, egy piros színű terméket képez, ami már levegőn is stabil. Ezután a gélt a szokásos módon fixáltam.

3.14. Standard DNS technikák

3.14.1. Kromoszómális DNS izolálása metanotróf törzsekből

4ml sejtet centrifugáltam (5000xg, 3 perc) egyetlen 1,5ml-es mikrocentrifuga csőben, majd felszuszpendáltam 300 µl SET pufferben (20% szacharóz, 50mM EDTA, 50mM Tris-HCl) és hozzáadtam 100µl 20%-os SDS-t. Harminc percen keresztül 55°C-on inkubáltam. A sejtek lizálása után 100µl 5M-os NaCl oldatot és 80µl 10%-os CTAB oldatot adtam az Eppendorf csőbe és 10 percre 65°C-ra helyeztem, majd 600µl kloroformmal extraháltam a felülúszót. A kloroformos extrakciót a még egyszer megismételtem és a már tiszta felülúszóhoz 500µl izopropanolt adva a kicsapódott DNS-t centrifugáltam. A DNS csapadékot kétszer mostam 1,5ml 70%-os, -20°C-os alkohollal és szárítás után 50µl TE pufferben feloldottam.

3.14.2. Plazmid tisztítás *Escherichia coli*-ből

5ml felnövesztett sejt kultúrából 3ml-t centrifugáltam (13000xg, 2 perc), a sejteket felszuszpendáltam 300µl 50mM Tris-Cl, pH=8,0; 10mM EDTA oldatban. 300µl 200mM NaOH, 1% SDS oldattal óvatosan összekevertem. 300µl 3M K-acetát, pH=5,5 hozzáadása után a csapadék összeállását segítő: 5perc, -20°C, majd centrifugáltam (13000xg, 10-20min). A felülúszóhoz 70% izopropanolt adtam. Ezután óvatosan homogenizáltam az elegyet, centrifugáltam (13000xg, 20 perc). A felülúszó eltávolítása után a csapadékot 70%-os alkohollal mostam (kb. annyi térfogattal, amennyi az eltávolított felülúszó mennyisége volt). Alkohol leszívása után a maradék alkoholt vízlégszivattyú segítségével távolítottam el, végül a DNS-t szárítottam. 50-100µl (víz vagy puffer)-ben oldottam fel.

3.14.3. DNS emésztése restriktív enzimekkel

A restriktív emésztéseket Boehringer, Fermentas, New England Biolabs és Stratagene enzimekkel végeztem, az enzimeket a saját gyári pufferükben használtam, a cégek ajánlásai szerint.

3.14.4. Agaróz gélelektroforézis

Az analitikai és preparatív célokból végzett gélelektroforézisekhez 1,0-2,0%-os, 0,5µg/ml EtBr-ot tartalmazó agaróz gélét használtam 1xTAE (Tris-acetát EDTA) pufferben, 7-9V/cm futtatási feszültséggel. A géleket digitális fényképezőgéppel dokumentáltam.

3.14.5. DNS izolálása gélből

MBI Fermentas elválasztó Kitet használtam:

Az agaróz gélben elválasztott fragmenteket kivágtam a gélből és megmértem a géldarabkák tömegét, majd a darabokat egy Eppendorf csőbe helyeztem. NaI oldatból a géldarabok tömegének háromszorosát adtam és 55°C-on 5 percig inkubáltam. Az agaróz feloldódása után 2µl szilika por szuszpenziót mértem az oldatba és újabb 5 percig inkubáltam 55°C-on, ezután centrifugáltam és a felülúszót eltávolítottam. A szilika port háromszor mostam mosó pufferrel, mindannyiszor felszuszpendáltam és centrifugáltam. Végül 50µl TE pufferrel eluáltam a felkötődött DNS-t a szilika porról (MBI Fermentas).

3.14.6. Polimeráz lánreakció (PCR)

A reakciókat Hybaid PCR Express típusú készülékben végeztem. A reakcióelegy az alábbi összetevőket tartalmazta: 5µl 10x DyNazyme vagy Pwo puffer, 4µl 2,5mM-os dNTP, 1-1µl 15pmol/µl-es primer, 10µl templát DNS, 28µl víz és végül 1U DyNazyme II (FINNZYMES) vagy 1U Pwo (Roche) enzimet adtam 50µl reakcióelegyhez. Templátként genomi DNS-t, vagy plazmid DNS használtam. Általában 30-35 ciklust futattam.

A PCR reakció profilja a következő volt: 5 perc, 95°C, a DNS polimeráz hozzáadása után 30 ciklus: 95°C, 1 perc, annealing hőmérséklet (60-65°C) 1 perc, majd elongáció 72°C, 1-1,5 perc, végül egy utolsó elongációs lépés rendszerint 10 perc, 72°C. Az elongáció időtartamát az 1 perc/1kb szabály alapján határoztam meg, 72°C-on hajtva végre a reakciót.

3.14.7. Ligálás

A ligálandó DNS fragmentet 2-5x feleslegben adtam a vektorhoz. Legtöbb esetben 0,5-2U Fermentas T4 DNS ligáz enzimet alkalmaztam 1x Fermentas T4 DNS ligáz pufferben, 16-22°C-on 1-16 órán át végezve a reakciót.

3.14.8. Kompetens sejt készítés kémiai módszerrel

Az XL-1 Blue MRF⁺, S17-1 λ pir sejteket 50ml SOB-ban, 22°C-on OD₆₀₀=0,4-0,6-ig növesztettem, 10 percig jégen inkubáltam, majd centrifugáltam 2500xg sebességgel, 4°C-on 10 percig. Az összegyűlt sejteket jégen 16ml TB pufferben szuszpendáltam fel, majd a fentiekhez hasonlóan centrifugáltam. A csapadékot 300 μ l DMSO-t tartalmazó, 4ml TB pufferben szuszpendáltam fel és 10 percig jégen inkubáltam, majd 100 μ l-enként előre lehűtött Eppendorf csövekbe szétosztottam. A sejteket folyékony N₂-ben való fagyasztás után -80°C -on tároltam felhasználásig (40).

3.14.9. Transzformálás

A transzformálandó DNS-t a sejtekhez adtam, melyeket ezután 30 percig jégen tartottam. A hősokkot követően (42°C, 45 másodperc) a sejtekhez 800 μ l SOB-t és 20 μ l 1M-os glükózt adtam, 37°C-on 1 órát rázatva inkubáltam, végül a megfelelő antibiotikummal kiegészített LB lemezre szélesztettem.

3.14.10. Konjugálás

M. capsulatus-t a konjugáció előtt két nappal 250ml-es lombikokba mért, 15ml NMS folyékony tápoldatba 3-4 telepről leoltottam, 25ml CH₄+CO₂ gázkeverék alatt 43°C-on egy éjszakán át inkubáltam. Másnap a metanotróf folyadék kultúrákat átoltottam 500ml-es lombikokba, 60ml NMS folyékony tápoldatba, 6ml tenyésztéssel beoltva. 43°C-on inkubáltam egy éjszakán át. Az *E. coli* törzseket 5ml megfelelő antibiotikum tartalmú LB folyadék tápoldatba leoltottam és 37°C-on rázattam egy éjszakán át. Harmadik nap az éjszaka felnőtt metanotróf kultúrákból 30ml-t, az *E. coli* kultúrákból 2ml-t fugáltam. A metanotróf kultúrákat

felszuszpendáltam 200µl NMS tápoldatban, az *E. coli* kultúrákat háromszor mostam 1ml NMS-el az antibiotikumok eltávolítása céljából, végül 100µl NMS-ben szuszpendáltam fel a baktériumokat. 100-100µl-t kevertem össze a metanotróf és *E. coli* sejtekből és a 200µl-t egy steril membránra cseppentettem, melyet előzőleg egy NMS+0,02% tripton lemezre helyeztem. CH₄+CO₂+levegő gázkeverék alatt 37°C-on inkubáltam 18-24 órát. A konjugációs idő letelte után a filterekről a baktériumokat lemostam, vitamin és antibiotikum tartalmú NMS (1,5% agar) táptalajra szélesztettem. A tenyészeteket CH₄+CO₂+levegő gázkeverék alatt 43°C-on inkubáltam 3-4 napig.

3.14.11. PCR termékek klónozása

3.14.11.1. *hupSL* mutáns előállítása

A membránkötött hidrogenáz géneket a [NiFe] hidrogenázokra jellemző, specifikus, konzervált N- és C-terminális szakaszokra tervezett primer párokkal azonosították a genomból (19). A $\Delta hupSL$ mutáns kettős homológ rekombinációval készült. A pJQ200SK, gentamicin rezisztencia markert és a kondicionálisan letális gént (*sacB*) hordozó, széles gazdaspecificitású vektort használtuk a konstrukciók létrehozásához. A pJQ200SK nem képes a *Methylococcus capsulatus*-ban replikálódni. Az *XhoI* restrikciós hasítóhelyet *SalI*-*ApaI* emésztéssel elimináltuk a vektor multiklónozó régiójából, a túlnyúló véget T4 polimerázzal töltöttük fel. A linearizált vektort magára ligáltuk, ezzel a pJQ300SK plazmidot kaptuk. A *M. capsulatus hup* fragmentje tartalmazza a *hupS* 5' végét, a *hupS* és *hupL* géneket két lépésben klónoztuk. Először egy 1,5 kb *PstI*-*NsiI* fragmentet illesztettünk a pJQ300SK *PstI* helyre, ezzel kaptuk a pJQ400SK plazmidot, amelyben megmaradt a *PstI* hasító hely. Második lépésben a 2 kb nagyságú *PstI* fragmentet a pJQ400SK plazmidba ligáltuk, ezzel előállt a pJQ500SK plazmid. A pJQ500SK 2 kb-os *XhoI* fragmentjét lecseréltük egy 1,5 kb *SalI* fragmentre, ami a kanamicin rezisztenciáért felelős génszakaszt kódolta. Ezután, az így kapott pJQ501 plazmidot konjugációval bejuttattuk a *M. capsulatus* (Bath)-ba. Az egyszeres rekombinások adták a *M. capsulatus* 501-es mutánsokat, majd a *sacB* gén segítségével, amelyet az eredeti pJQ200SK plazmid már eleve tartalmazott, szelektáltunk a kétszeres rekombinánssokra. *M. capsulatus*-t, 10% szacharózt tartalmazó tápoldatban, 2 napig rázatva inkubáltuk. A kétszeres rekombinánssokat negatív szelekcióval választottuk ki. A kétszeres rekombinációval kapott *M. capsulatus* 502 mutánsokat Southern hibridizációval és PCR

reakcióval ellenőriztük le, *hup280fw* (5'-ATCAAGCGATCCCACATG-3') és *hup2328rev* (5'-GATCTTGACGATTTTCCTT-3') primereket használtunk.

3.14.11.2. *hoxH* mutáns előállítása

A NAD⁺-redukáló, szolubilis hidrogenáz enzim hidrogenáz dimerének nagy alegységét kódoló gén mutációját kétszeres rekombinánsok előállításával hajtottuk végre. A *hox* génklaszter *hoxH 2* fragmentjét klónoztuk. Első lépésben az 5' (upstream) *EcoRI-KpnI* (505 bp) PCR-rel sokszorozott fragmentet (*hox-1*) klónoztuk pUC19 plazmidba. Kék-fehér szelekcióval választottuk ki a pozitív klónokat. Kolónia PCR-rel (primerek: HOXHfw (TTGAATTCGGTGCAGCGGCTGTGT), HOXHkrev (TAGGTACCAGGCCGAAGCGTTCAT)) és *BamHI-EcoRI* emésztéssel ellenőriztük a fragment beépülését. Ezután p34S-Gm plazmidból emésztés (*KpnI*) és fragmentizolálás után kinyert gentamicin kazettát pUC19*hox1* plazmidba ligáltuk. Gentamicinre szelektáltunk, az fragment beépülését kolónia PCR-rel ellenőriztük. A másik (*hox-2*) (472 bp) *BamHI-HindIII* fragmentet pKMS plazmidba ligáltuk, kék-fehér szelekciót követően az ellenőrzést szintén kolónia PCR-rel, illetve megfelelő restrikciós enzimekkel való emésztéssel hajtottuk végre. Végül a pUC19h-Gm konstrukcióból *BamHI-EcoRI* kettős emésztéssel kivágott, izolált *hox1*-Gm fragmentet klónoztuk a pKMS*Hox-2* vektorba. Kanamicinre és gentamicinre szelektáltunk, a fragment beépülését szintén kolónia PCR-rel és restrikciós enzimmel való emésztéssel ellenőriztük. S17λ-pir kompetens sejtbe való transzformálás után, *M. capsulatus* (Bath) törzsbe konjugáltuk az elkészült pKMS610 konstrukciót. Kétszeres rekombinánsokat kerestünk gentamicin rezisztenciára szelektálva. A második rekombinációs esemény bekövetkezését PCR reakcióval ellenőriztük HOXHfw (5'-AGGAGCTC-GGCCTATTCCAAGGTC-3') és HOXHrev (5'-AGGAGCTC-TAGCCGAAGACCAGCA-3') primereket használtunk.

3.14.12. Southern hibridizáció

20xSSC: 3M NaCl, 0,3M tri-nátrium-citrát 2-hidrát (pH=7,0)

TE puffer: Tris-Cl 10mM, EDTA 1mM (pH=8,0)

TAE: 0,004M Tris-acetát, 0,001M EDTA

TBE: 100mM Tris-Cl, 100mM bórsav, 2mM EDTA (pH=8,0)

Hibridizáló oldat: 5xSSC, 0,5v/v% blokkoló reagens, 0,1v/v% N-lauroilszarkozin Na-sója, 0,02 v/v% SDS

Puffer I: 100mM Tris-Cl (pH=7,5), 150mM NaCl

Puffer II: 0,5v/v% blokkoló reagens Puffer I-ben

Puffer III: 100mM Tris-Cl (pH=9,5), 100mM NaCl, 1mM MgCl₂

3.14.12.1. Digoxigeninnel jelölt próba készítése

A PCR termékeket gélelektroforézissel történő elválasztás után izoláltam a gélből. Tipikusan 50-300ng DNS-t 16µl térfogatra egészítettem ki vízzel, így 95°C-on 10 percig denaturáltam, majd azonnal jégre raktam. A próba jelölésére minden esetben a taláalomra hibridizáló primer módszert használtuk ("random priming"): 2µl hexanukleotid primer keveréket, 2µl digoxigenin-jelölt nukleotid oldatot és 1U Klenow polimerázt adtam hozzá, és 37°C-on inkubáltam egy éjszakán át. 2µl 0,2M-os EDTA (pH=8,0) oldattal állítottam le a reakciót, majd 2µl 4M LiCl és 60µl 95%-os alkohol hozzáadása után -20°C-ra helyeztem 30 percre. Centrifugálás után (10000xg, 10 perc, 4°C) a csapadékot 70%-os alkohollal mostam, majd szárítottam. A jelölt DNS-t 200µl TE-ben vagy vízben oldottam fel. (Boehringer Mannheim Biochemicals).

3.14.12.2. Southern blot, hibridizálás és detektálás

A megfuttatott géleket, a hosszú DNS darabok fragmentálása céljából 0,25M sósavban áztattam, 15 percig. A gélt ezután 30 percig denaturáló oldatban (0,5M NaOH, 1,5M NaCl), 30 percig neutralizáló oldatban (1M Tris-HCl pH=8,0, 1,5M NaCl) áztattam. Ezt követően kapilláris transzferrel HybondN+ (Amersham) membránhoz kötöttem a DNS-t. A membránokat 5 percre 6xSSC-ben mostam, szárítottam, majd 80°C-on 2 órán át inkubáltam. (A következő hibridizációs hőmérsékleteket alkalmaztam: 68-55°C (*hox* elleni heterológ próbák), illetve 68 és 65°C (*hoxH* próba)).

A 68°C 1 óra hibridizáló oldatban (5xSSC, 0.5 v/v% blokkoló reagens (Boehringer), 0.1v/v% N-lauroilszarkozin Na-sója, 0.02v/v% SDS) való előhibridizálást követően új hibridizáló oldatban hozzá adtam a jelölt, denaturált DNS próbát, és egy éjszakán át hibridizáltam. Másnap 68°C-on mostam: (2xSSC, 0,1% SDS 5 perc), (2xSSC, 0,1% SDS 15 perc), (1xSSC,

0,1% SDS 15 perc), (0,1xSSC, 0,1% SDS 15 perc), (0,1xSSC, 0,1% SDS 15 perc), (2xSSC, 0,1% SDS a fűtést kikapcsoltam és megvártam míg 40°C alá csökken a hőmérséklet). Ezután 5 percig puffer 1-ben (100mM Tris-HCl (pH=7,5), 150mM NaCl), 30 percig puffer 2-ben (puffer 1+0,5v/v% blokkoló reagens) mostam, majd 1 órán át inkubáltam puffer 2-ben, melyhez alkalikus foszfatázzal kapcsolt digoxigenin ellen termeltetett antitestet adtam 1:2500 hígításban. Kétszer 15 percig mostam puffer 1-ben, 5 percig puffer 3-ban (100mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 5-50mM MgCl₂). Végül 1-1ml CSPD-t szélesztettem a membránokra és 5 percig szobahőmérsékleten inkubáltam, majd a membránokat fóliába csomagolva egy fotókazettába helyeztem. A detektáláshoz használt filmet egy sötét szobában helyeztem a membránokra, és 10-40 percig hagytam ott. A filmet 2 percig a hívó folyadékba, 2 percig a fixáló folyadékba végül pedig vízbe helyeztem.

3.15. Számítógépes programok

A DNS és fehérje szekvenciák számítógépes analízisét a GenBank adatbázisban, a BLAST, BLASTX és PROSCAN programok segítségével végeztük.

Homológia kereséshez a TIGR befejezetlen mikrobiális genomot használtuk a TIGR BLAST Search Engine for Unfinished Microbial Genomes: <http://tigrblast.tigr.org/ufmg/> program segítségével.

A genomszekvenciához a The Institute for Genomic Research website at <http://www.tigr.org> honlapon keresztül kaptunk hozzáférést.

4. Eredmények és értékelésük

4.1. A hidrogén és a metán anyagsere közötti kapcsolat

Hidrogén hajtott sMMO és pMMO aktivitást mutattam ki *M. capsulatus* (Bath) egész sejtben. Maximális aktivitást mindkét esetben 10% gáztérbe juttatott hidrogén esetén mértem. Kontrollként minden esetben Na-formátot használtam. A formát és hidrogén hajtott MMO aktivitások összehasonlítását a 4. táblázatban tüntettem fel.

	50% hidrogén (gáztérben)	20mM Na-formát
pMMO	53	41
sMMO	24	31

4. Táblázat. Hidrogén és Na-formát hajtott egész sejttes MMO aktivitások (nmol propilén-oxid (perc x mg fehérje)⁻¹). Az értékek három független mérés átlaga.

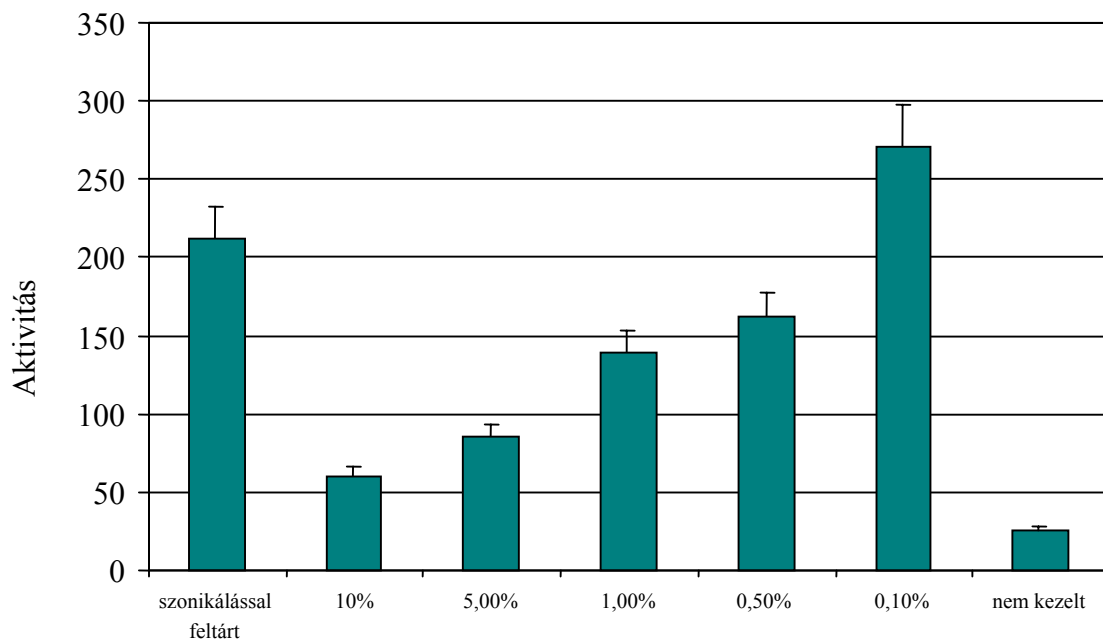
Ezzel igazoltam, hogy a metán és hidrogén anyagsere között kapcsolat áll fenn. A baktérium biztos, hogy tartalmaz legalább egy hidrogenáz enzimet.

4.2. Hidrogenáz enzim (ek) kimutatása aktivitásmérésekkel

A hidrogén felvevő és hidrogénfejlesztő aktivitásmérési technikákat optimalizáltam *M. capsulatus* (Bath) egész sejtekre. Egész sejtben hidrogén felvevő és fejlesztő irányban mért hidrogenáz aktivitásokkal igazoltam, hogy a baktériumban expresszázó hidrogenáz enzim aktív. Erlenmeyer lombikban egy napig rázatott kultúra hidrogén fejlesztő aktivitása 108nmol H₂ (perc x mg fehérje)⁻¹ volt (3. Diagram, 65. oldal). Mesterséges elektrondonorként redukált metilviologént használtam.

A hidrogén felvevő aktivitást metilénkéket használva mesterséges elektron akceptorként, először egész sejttel mutattam ki. A metilénkékről ismert (69), hogy általában jó elektron

akceptora a membránkött hidrogenázoknak. Alkalmazásának hátránya azonban a magas redox potenciálja ($E_0' = +11\text{mV}$). Ennek az a következménye, hogy számos, a baktériumban jelen lévő redukált redox rendszer vagy kofaktor, melynek a redox potenciálja negatívabb a metilénkéknél, képes a metilénkéek elredukálására, ami a hidrogenáz aktivitás túlbecsléséhez vezet. A háttéraktivitást minden esetben, hidrogén gázt nem tartalmazó negatív kontroll alkalmazásával küszöböltem ki. Az egész sejtes méréseknél felmerült még egy további probléma. A háttéraktivitás miatt nem lehetett egyértelmű, specifikus metilénkéek redukáló hidrogén felvevő aktivitást kimutatni. Erre kétféle magyarázatot találtam. Az egyik, hogy az irodalomban leírtakat megcáfolva, az általam tanulmányozott membránkött hidrogenáz nem képes a metilénkéek redukációjára. A másik lehetséges magyarázat a gyenge aktivitásra, hogy a metilénkéek nehezen és csak kis mértékben jut át a sejt falon. Az utóbbi feltevés helyességének igazolására két módszert alkalmaztam. Az első a szonikálással történő sejt feltárás. A szonikálás paraméterei megegyeznek a szolubilis és membrán frakció előállításánál használt szonikálási paraméterekkel [39. oldal]. A sejt feltárás hatására a detektálható hidrogén felvevő aktivitás szignifikánsan növekedett (1. Diagram). A szonikálás hatására azonban a sejtet feltárom, ezáltal a citoplazmatikus frakció is könnyebben hozzáférhetővé válik. Ez azt jelenti, hogy a megemelkedett metilénkéek redukáló hidrogén felvevő aktivitás egy, a citoplazmában található egyéb hidrogenáztól is származhat. Ez abban az esetben lehetséges, ha az egész sejtes mérés során a metilénkéek nem jut át a sejt membránra. Ezért választottam a kíméletesebb, detergenssel történő kezelést. A Triton X-100 egy, a membránkött hidrogenázok szolubilizálására elterjedten használt nem ionos detergens. A detergens hozzáadásával a festék hozzáférhetővé vált az enzim számára.



1. Diagram. A Triton X-100 kezelés hatása *M. capsulatus* egész sejtés metilénkérek redukáló hidrogén felvevő aktivitásra. Az aktivitás értékek $\text{nmol H}_2 (\text{perc} \times \text{mg fehérje})^{-1}$ értékben feltüntetve.

Több magyarázat lehetséges:

1. Az irodalomban eddig leírt [NiFe] hidrogenázok túlnyomó többsége a membránban „kihorgonyozva” helyezkedik el. Az aktív centrum általában a periplazmatikus tér fele orientált (2). A detergens a sejtfal szerkezetének fellazításával „szabad” utat biztosít a metilénkérek számára, mely képes eljutni a sejtmembránban elhelyezkedő membránkötött hidrogenázig

2. A detergens azáltal könnyíti meg a festék-enzim kapcsolat kialakulását, hogy megváltoztatja az enzim konformációját.

3. Lehetséges, hogy a metilénkérek esetünkben az irodalomtól eltérően, nem membránkötött hidrogenázzal reagál. Ezt a 4.3. pontban leírt kísérlettel zártam ki.

4. Lehetséges még az is, hogy a citoplazmában levő formát-hidrogén liáz komplex eléréséhez szükséges a detergens. A mért aktivitás tehát a komplextől is származhatna. Ennek lehetőségét szintén a 3. Pontban említett lokalizációs kísérlet zárja ki.

A detergens-koncentráció emelkedésével a hidrogenáz aktivitás csökken, feltételezhetően a Triton X-100 hatása olyan molekuláris változásokat idéz elő az enzimben, ami az aktivitás detergens-függő csökkenéséhez vezet.

Maximális hidrogén felvevő aktivitást ($271 \text{ nmol H}_2 \text{ (perc} \times \text{ mg fehérje)}^{-1}$) 0,1% detergens alkalmazásával mértem (1. Diagram). A további egész sejttes metilénkék redukáló hidrogenáz aktivitásmérésekhez az optimalizált permeabilizáló protokollt alkalmaztam. Az eredmények igazolták a feltevést, miszerint a *M. capsulatus* tartalmaz legalább egy aktív hidrogenázt.

Hidrogenáz aktivitást egész sejttel, más redukált szubsztrátok jelenlétében is mértem [5. Táblázat]. A viologének mellett Na-formáttal is kimutattam hidrogénfejlesztő hidrogenáz aktivitást. A Na-formátot a baktérium formát-dehidrogenáz enzimével széndioxiddá oxidálja, közben redukált kofaktor, NADH keletkezik.

Törzs	Redukált szubsztrát					Szubsztrát mentes kontroll
	Na-formát	MV	BV	MK	Na-ditionit	
Vad típus	7,7	12,9	7,6	1,6	1,3	1,0

5. Táblázat. Hidrogénfejlesztő aktivitás *M. capsulatus* egész sejtben. Az aktivitások $\text{nmol H}_2 \text{ (perc} \times \text{ mg fehérje)}^{-1}$ egységben kifejezve.

4.3. Az aktivitás lokalizációja

A metilénkék redukáló aktivitás lokalizációjának eldöntésére szolubilis és membrán frakciót preparáltam.

Szolubilis és membrán frakcióból, hidrogénfelvevő és -fejlesztő irányban, egyéb szubsztrátokat használva mértem hidrogenáz aktivitást [6. Táblázat]. Metilénkéssel hidrogén felvevő irányban működő aktivitást kizárólag a membrán frakcióban detektáltam. Sikerült kimutatni ezen kívül egy, kizárólag a szolubilis frakcióra jellemző NAD^+/NADH függő aktivitást. A membránkötött hidrogenázokról köztudott, hogy többségük nem képes a NAD^+ -ot elektron akceptorként felhasználni. Ezek az eredmények valószínűsítik a membránkötött hidrogenáz mellett, egy, a szolubilis frakcióban elhelyezkedő NAD^+ redukáló szolubilis hidrogenáz jelenlétét. NADPH -t használva elektron donorként egy esetben sem találtam mérhető aktivitást.

Továbbá az is megállapítható, hogy a hidrogéntermelő aktivitás mérésére a metilviologén a legjobb mediátor, és preferáltan felvevő aktivitás mérhető a membrán és szolubilis frakciókban egyaránt.

	Hidrogén felvétel				Hidrogén termelés			
	NAD^+	BV	MV^{2+}	MK^+	NADH	BV	MV^+	MK
Szolubilis	25,5	9,5	1,7	17,5	2,9	6,0	11,3	0,6
Membrán	0	3,7	0,4	84,3	0	1,2	4,0	0

6 .Táblázat. Hidrogénfelvevő és -fejlesztő aktivitás. Az aktivitások $\text{nmol H}_2 \text{ ox./red. (perc x mg fehérje)}^{-1}$ egységben feltüntetve. Az értékek legalább három független mérés átlagából származnak.

4.4. Hidrogenáz gének

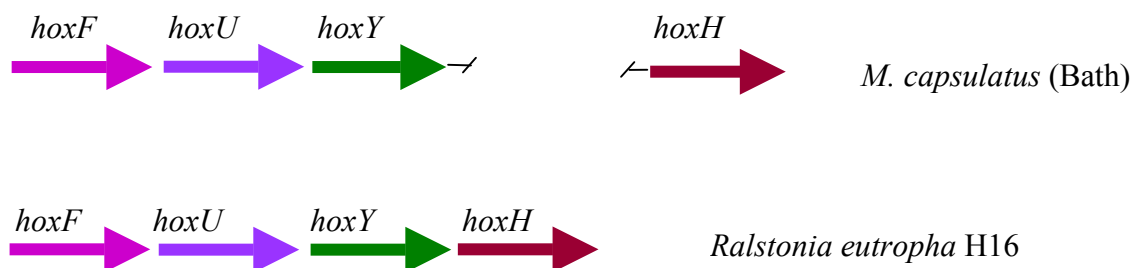
4.4.1. Membránkötött hidrogenáz gének azonosítása

Methylococcus capsulatus (Bath) obligát metanotróf baktérium membránkötött hidrogenáz géneit *Thiocapsa roseopersicina* fototróf bíbor-kén baktériumból származó heterológ próbát használva detektáltuk (19). A struktúrgéneket klónoztuk, szekvenáltuk.

4.4.2. Szolubilis hidrogenáz gének azonosítása

Southern hibridizáció segítségével, különböző mikroorganizmusokból (*Ralstonia eutropha*, *Anabaena variabilis*, *Desulfovibrio fructosovorans*) származó heterológ próbával a *Methylococcus capsulatus* szolubilis hidrogenáz gének nem azonosíthatók. Időközben azonban megkezdődött és jórészt be is fejeződött a *M. capsulatus* (Bath) genom szekvenálása. A genomszekvencia ismeretében *in silico* analízissel további hidrogenáz géneket kódoló operonokat azonosítottunk

A szekvencia ismeretében számítógépes analízis segítségével sikerült egy NAD⁺-redukáló hidrogenáz négy struktúrgénjének azonosítása (6. Ábra). A gének feltételezett termékei a más mikroorganizmusokból már ismert, tipikus NAD⁺-redukáló hidrogenázok struktúrgénjeivel a 7. Táblázatban feltüntetett legmagasabb fehérjeszintű százalékos azonosságát mutatják.



6. Ábra. Szolubilis hidrogenázt kódoló struktúrgének.

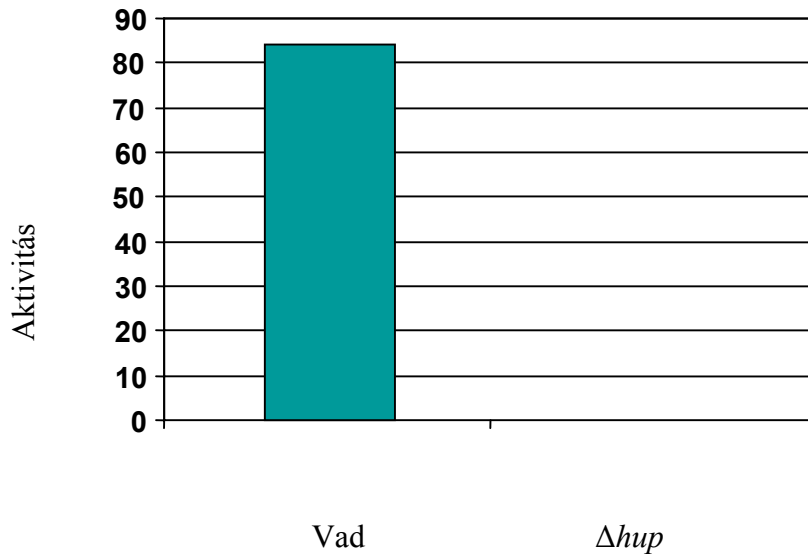
Faj	Azonosság %			
	HoxF	HoxU	HoxY	HoxH
<i>Ralstonia eutropha</i> H16	44	43	47	48
<i>Anabaena variabilis</i>	39	36	44	47
<i>Desulfovibrio fructosovorans</i>	40	30	29	31

7. Táblázat: *Methylococcus capsulatus* (Bath) *hoxFUYH* gének fehérjeszintű azonossága jellegzetes struktúrgénekkal (számítógépes kiértékelés).

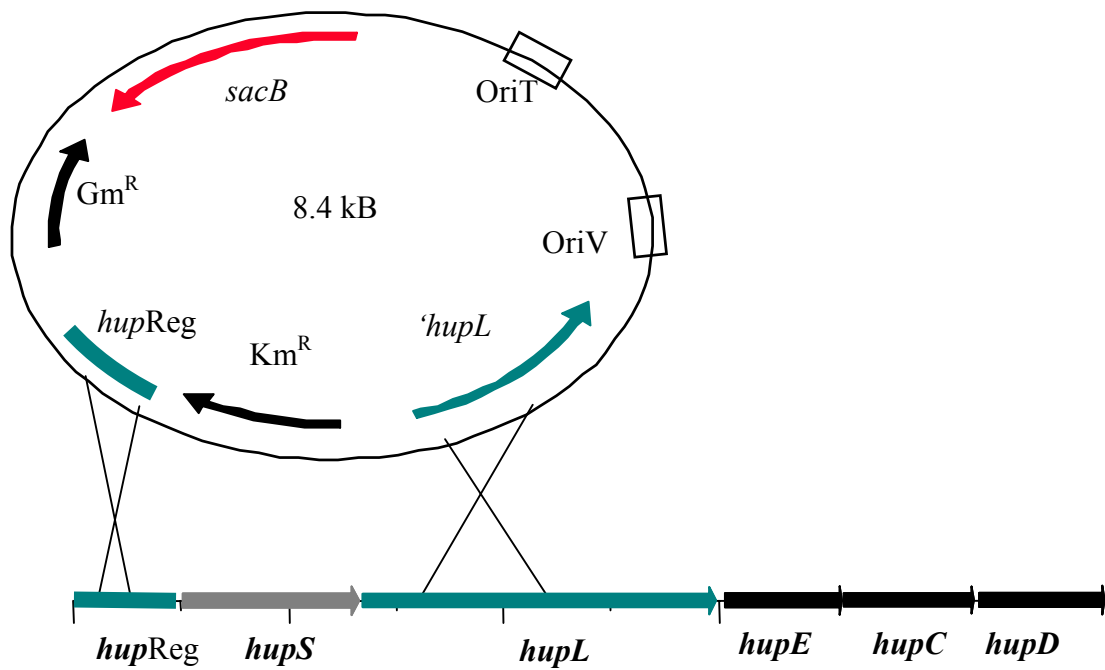
4.4.3. Membránkötött hidrogenáz mutáns létrehozása

A membránkötött hidrogenáz *hupSL* struktúrgénjeinek markercserés mutagenézisével (Δhup) mutáns törzset hoztunk létre [7. Ábra]. A Δhup mutáns létrehozása után a membrán frakcióból eltűnt a hidrogénfelvevő aktivitás [2. Diagram]. Tehát a metilénkéssel mért hidrogénfelvevő hidrogenáz aktivitás a membránkötött hidrogenázra specifikusan jellemző. Másik levonható következtetés, hogy a membránban csak egyetlen (HupSL) hidrogenáz található.

A NAD⁺-redukáló hidrogenáz aktivitás továbbra is mérhető a szolubilis frakcióban [9. Táblázat, 66. oldal]. Ezzel egyértelművé vált a membránkötött hidrogenáz mellett egy másik aktív hidrogenáz jelenléte is a baktériumban.



2. Diagram. Hidrogénfelvevő hidrogenáz aktivitás a membrán frakcióban. Elektron akceptor: metilénkék. Az aktivitások a függőleges tengelyen nmol H_2 (perc x mg fehérje)⁻¹ értékben kifejezve.



7. Ábra. *M. capsulatus* *hupSL* gén markeres mutagenezise dupla homológ rekombinációval pJQ501 plazmiddal.

Hidrogénfejlesztő aktivitást mértem a Δhup törzsben Na-formát elektron donor jelenlétében. Az aktivitás jelen van a mutánsban is, ami tovább erősíti egy NADH-t oxidálni képes, esetleg formát dehidrogenáz enzimhez kapcsolt hidrogenáz enzim jelenlétét a baktériumban [8. Táblázat].

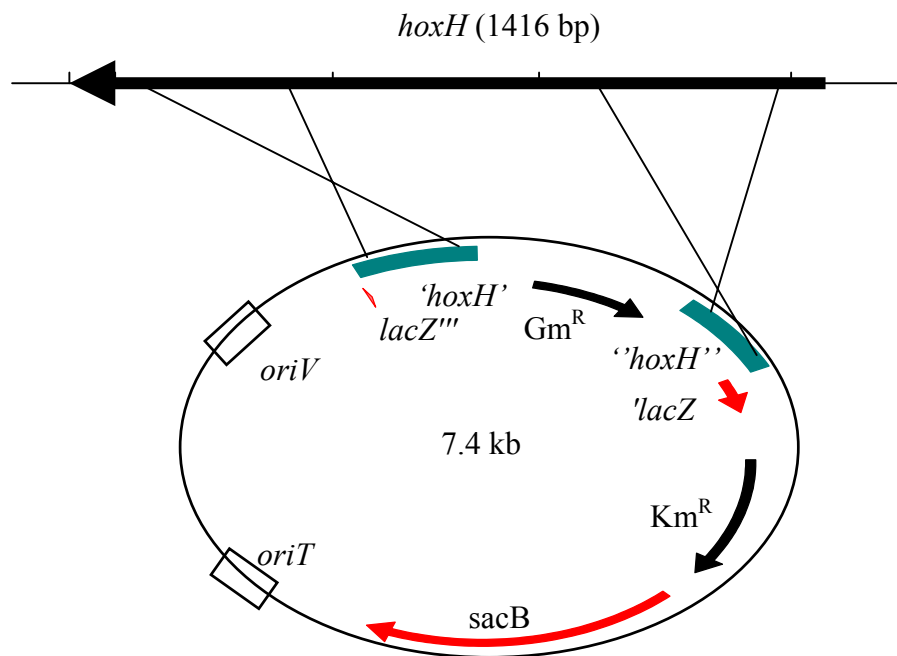
Törzs	Redukált szubsztrát					Szubsztrát mentes kontroll
	Na-formát	MV	BV	MK	Na-ditionit	
Vad típus	7,7	12,9	7,6	1,6	1,3	1,0
$\Delta HupSL$	10,4	15,9	10,3	1,6	1,7	1,1

8. Táblázat. Hidrogénfejlesztő aktivitás *M. capsulatus* egész sejtben. Az aktivitások nmol H₂ (perc x mg fehérje)⁻¹ egységben kifejezve.

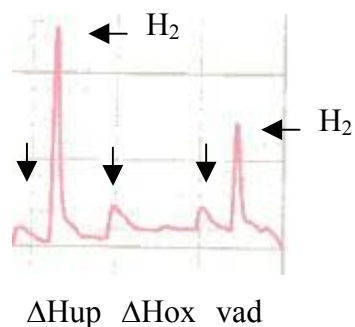
4.4.4. Szolubilis hidrogenáz mutáns létrehozása

A kérdés megválaszolására, hogy a detektált NAD⁺-függő enzimaktivitás az azonosított, szolubilis hidrogenázokkal homológiát mutató struktúrgénekről szintetizált hidrogenáz enzimtől származik, $\Delta hoxH$ mutánst hoztunk létre. A mutáns létrehozásához a pKMS610 plazmidot használtuk, mely tartalmazta a hidrogenáz HoxH nagy alegységet kódoló gén 5' régiójának és 3' végének egy-egy kb. 200 bázispáros szakaszát és egy gentamicin rezisztenciáért felelős gént [8. Ábra]. A *hoxH* mutánsból eltűnt a NAD⁺-függő hidrogén felvevő és hidrogenfejlesztő aktivitás is [9. Ábra, 61. oldal], ami egyértelműen igazolja, hogy a *hox* génklaszterrel expresszálandó fehérje aktív. A mutánsból preparált szolubilis frakció fehérjéit natív, gradiens poliakrilamid gélen, elektroforézissel elválasztottam. Ezután hidrogén felvevő aktivitást detektáltam gélben. A HoxH mutáns szolubilis frakcióból [9. Ábra, 61. oldal] eltűnt a benzilviologénes hidrogén felvevő aktivitás, ez is alátámasztja a *hoxH* gén funkcionális voltát. A gélben azonban további hidrogenáz aktivitásokat detektáltam. Ez felveti annak a lehetőségét, hogy a baktérium a már azonosított két hidrogenázon kívül további hidrogenáz enzim (ek) et szintetizál. *In silico* analízissel azonosítottunk a genomban további

két, az *E. coli* harmadik (*hyc*) hidrogenázával fehérjeszinten 24%, negyedik (*hyf*) hidrogenázának alegységeivel 29%-os azonosságot mutató hidrogenázt kódoló géneket.

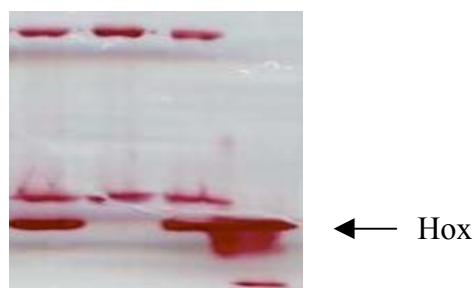


8. Ábra. A *hoxH* mutáns létrehozásához készített pKMS610 plazmid.



9. Ábra. *hoxH* mutáns ellenőrzése hidrogénfejlesztő aktivitásméréssel (elektron donor: NADH). A termelődött, gázterébe jutott hidrogént gázkromatográfiás analízissel detektáltam. A nyilak az injektálás pillanatát és a hidrogéncúcsokat jelzik.

vad ΔHox ΔHup *R.e.*



10. Ábra. Hidrogénfelvevő hidrogenáz aktivitás kimutatása natív gélben (5-15%) szolubilis frakciókból (*R.e.*: *Ralstonia eutropha*).

4.4.5. Hidrogenáz struktúrgének térképezése metanotrófokban

Annak a kérdésnek a megválaszolására, hogy a hidrogenáz gének mennyire elterjedtek a metanotróf baktériumokban, membránkötött és NAD⁺-függő, szolubilis hidrogenáz gének előfordulását vizsgáltam különböző metanotróf törzsekben.

4.4.5.1. Membránkötött hidrogenáz gének keresése

Methylococcus capsulatus (Bath) membránkötött hidrogenáz nagy alegységéből (*hupL*), PCR láncreakcióval készített, random Dig-jelölt próbával hibridizáltam nyolc különböző metanotróf törzs genomi DNS-sel, amelyeket előzőleg restrikciós enzimekkel külön-külön (*PstI*, *Sall*) emésztettem. Az eredmény szerint (11. Ábra) a vizsgált metanotrófok közül a következőkben találtam *M. capsulatus* MBH nagy alegységgel homológ szekvenciákat:

Methylomonas methanica S1

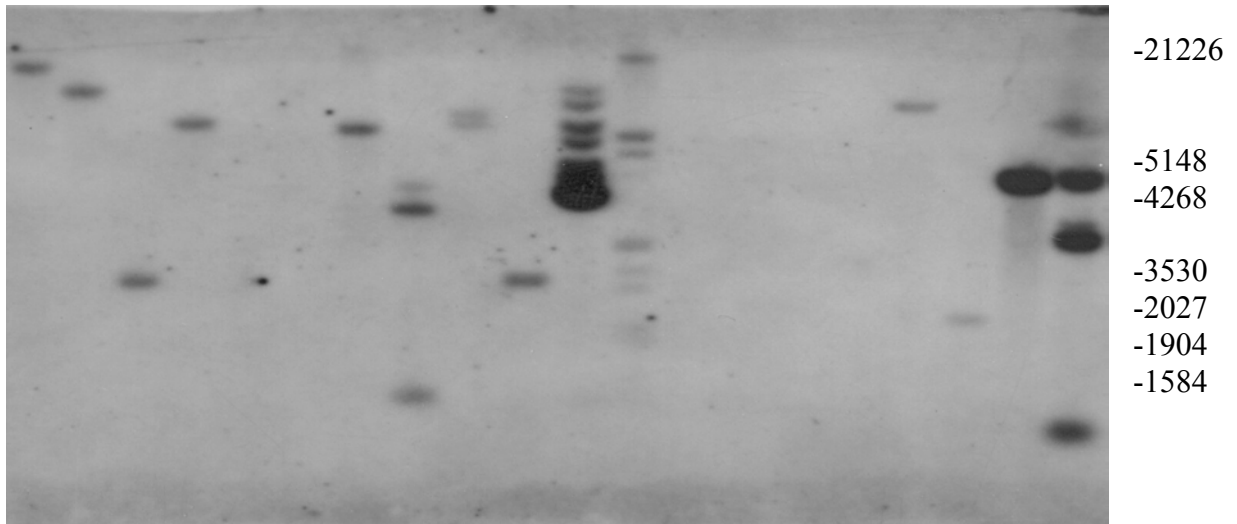
Methylobacter luteus Y

Methylocaldum szegediense OR2

Methylocystis parvus OBBP

Methylocystis strain M

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 1kb DigM 11 12 13 14 15 16 17 18



- | | |
|--|---|
| 1. <i>Methylocystis</i> sp. S1-PstI | 9. <i>Methylocystis parvus</i> OBBP-PstI |
| 2. <i>Methylocystis</i> sp. S1-SalI | 10. <i>Methylocystis parvus</i> OBBP-SalI |
| 3. <i>Methylomicrobium album</i> BG8-PstI | 11. <i>Methylosinus trichosporium</i> OB3b-PstI |
| 4. <i>Methylomicrobium album</i> BG8-SalI | 12. <i>Methylosinus trichosporium</i> OB3b-SalI |
| 5. <i>Methylosinus</i> strain Y-PstI | 13. <i>Methylobacter</i> sp. LK5-PstI |
| 6. <i>Methylosinus</i> strain Y-SalI | 14. <i>Methylobacter</i> sp. LK5-SalI |
| 7. <i>Methylocaldum szegediense</i> OR2-PstI | 15. <i>Methylocystis</i> sp. M-PstI |
| 8. <i>Methylocaldum szegediense</i> OR2-SalI | 16. <i>Methylocystis</i> sp. M-SalI |
| | 17. <i>Methylococcus capsulatus</i> (Bath)-PstI |
| | 18. <i>Methylococcus capsulatus</i> (Bath)-SalI |

11. Ábra. *hup* típusú gének metanotrófokban.

4.4.5.2. Szolubilis hidrogenázt kódoló gének keresése

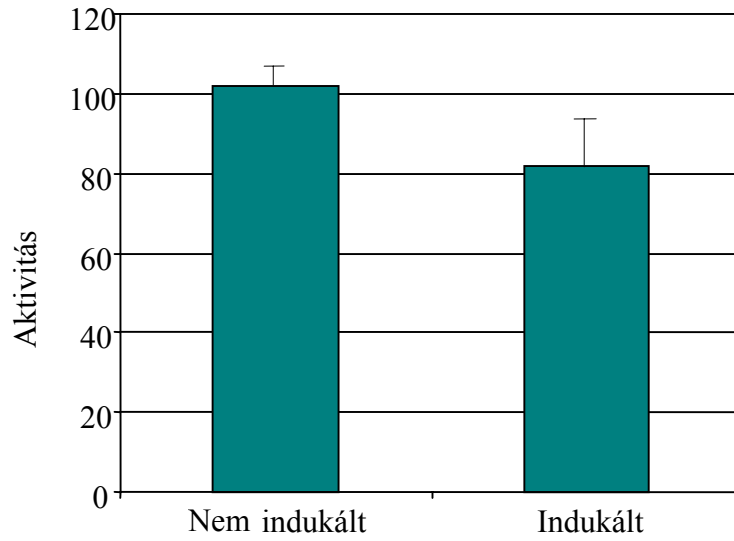
A membránkött hidrogenáz gének keresésénél tesztelt metanotróf baktériumokban NAD^+ -függő szolubilis hidrogenáz (*hoxH*) géneket kerestem. A hidrogenáz dimer nagy alegységét kódoló struktúrgénből (*hoxH*) készített próbát használva, Southern hibridizációval *M. capsulatus* *hoxH*-val homológiát mutató gént nem detektáltam. Ez az eredmény azonban nem zárja ki annak a lehetőségét, hogy a vizsgált metanotrófokban ez a típusú hidrogenáz génklaszter megtalálható.

4.5. Hidrogenáz enzim (ek) biokémiai jellemzése

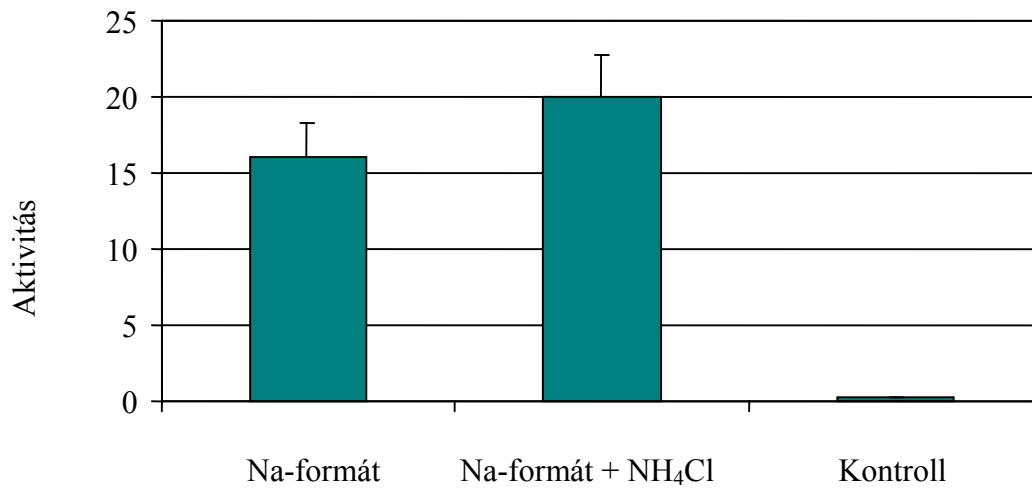
4.5.1. Különböző növesztési körülmények: konstitutív vagy indukálható az aktivitás?

Rázatva nevelt *M. capsulatus* kultúrát 5% légtérbe juttatott hidrogénnel indukáltam, ami csökkentette ugyan az egész sejtes hidrogénfejlesztő aktivitást, de ez az egyes kultúrák aktivitása közötti különbségből adódott, nem tekinthető a hidrogén hatására bekövetkezett aktivitás-változásnak. (82nmol H_2 (perc x mg fehérje)⁻¹) (3. Diagram). A következtetés levonható, miszerint külső forrásból származó molekuláris hidrogén nem vált ki indukciót.

A *Methylococcus capsulatus* (Bath) is tartalmazza a prokariótákra jellemző nitrogénfixálásra alkalmas nitrogénáz enzimkomplexet. Az egyéb nitrogénforrások kimerülése után, illetve a tápoldatban levő nitrogénforrás hiányában a baktérium képes a nitrogén megkötésére. Tehát a detektált hidrogén, bizonyos növesztési körülmények között, a nitrogénáz enzim működésének következtében is megjelenhet a rendszerben. A nitrogénáz szerepét a hidrogéntermelésben úgy zártam ki, hogy ammónium-kloriddal gátoltam a nitrogénáz működését (4. Diagram) (51). Ez nem gátolta a hidrogénfejlődést, ami bizonyítja, hogy a hidrogéntermelés hidrogenáz enzimtől származik.



3. Diagram. Hidrogénfejlesztő aktivitás *M. capsulatus* (Bath) egész sejtekben redukált metilviologénnel mérve. Az aktivitások $\text{nmol H}_2\text{-fejlesztés (perc x mg fehérje)}^{-1}$ egységben kifejezve.



4. Diagram. Hidrogénfejlesztés *M. capsulatus* (Bath) egész sejtben. Az aktivitás értékek $\text{nmol H}_2 \text{ (perc x mg fehérje)}^{-1}$ egységben.

Nitrogénfixáló és nitrogénáz gátolt körülmények között megmértem külön a membrán és szolubilis frakció hidrogenáz aktivitását (9. és 10. Táblázat). Szignifikáns különbséget nem mutattam ki. A beazonosított két hidrogenáz enzim esetén nitrogénfixáló körülmények hatására indukciónak nem mérhető.

Továbbá, nitrogén fixáló körülmények nem indukálják további olyan hidrogenáz enzim szintézisét, mely aktivitása az általam használt elektron donorokkal, illetve elektron akceptorokkal kimutatható.

<i>M. capsulatus</i> frakciók	Nitrogenáz gátolt				Nitrogénfixáló			
	NAD ⁺	BV	MV ²⁺	MK ⁺	NAD ⁺	BV	MV ²⁺	MK ⁺
vad szolubilis	25,5	9,5	1,7	17,5	16	12	5,5	25
vad membrán	0	3,7	0,4	84	0	17,5	0,2	49
<i>Δhup</i> szolubilis	23,5	21	4,8	0	14	12	6,5	0
<i>Δhup</i> membrán	0	0	0	0	0	0	0	0

9. Táblázat. Hidrogén felvevő aktivitás különböző növesztési körülmények között. Az aktivitások nmol H₂ (perc x mg fehérje)⁻¹ egységben feltüntetve. NADP⁺-t használva elektron akceptorként egy esetben sem mérhető aktivitás. Az értékek legalább három független mérés átlagából származnak.

<i>M. capsulatus</i> frakciók	Nitrogenáz gátolt				Nitrogénfixáló			
	NADH	BV	MV ⁺	MK	NADH	BV	MV ⁺	MK
vad szolubilis	2,9	6,0	11,3	0,6	1,4	4,8	13,7	0,9
vad membrán	0	1,2	4,0	0	0	1,5	3,0	<0,1
Δhup szolubilis	2,4	4,7	15,3	0,8	2,3	2,2	9,1	0,4
Δhup membrán	<0,1	<0,1	<0,05	0	<0,1	0,1	1,0	0

10. Táblázat: Hidrogénfejlesztő aktivitáskülönböző növesztési körülmények között. Az aktivitások nmol H₂ (perc x mg fehérje)⁻¹ egységben feltüntetve. NADPH-t használva elektron donorként egy esetben sem mérhető aktivitás. Az értékek legalább három független mérés átlagából származnak.

Mivel sem külső forrásból származó hidrogénnel, sem a növesztési körülmények változtatásával nem mérhető szignifikáns aktivitásváltozás (9. és 10. Táblázat), a két enzim konstitutív expresszióját kell feltételeznünk.

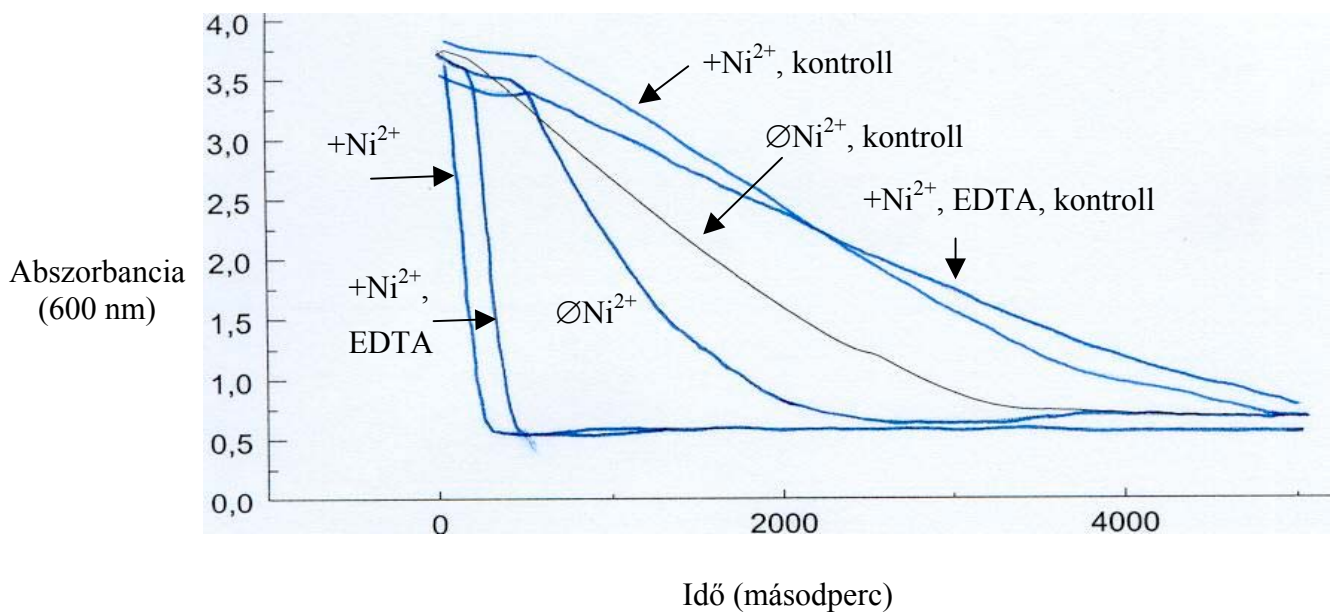
Arról nincs információ, hogy esetleg a baktérium által (egyéb hidrogenáz enzim vagy a nitrogenáz enzimkomplex) termelt hidrogén hatására indukálódna egyik vagy másik enzim. A mutánsokban (nitrogenáz gátolt körülmények között) mérhető aktivitások alapján nem igaz a fenti feltételezésünk. Abban az esetben, ha a baktérium nem tartalmaz kettőnél több, *in vivo* hidrogént termelő hidrogenázt, mely lehetőséget egyértelműen nem tudjuk kizárni, az enzimek hidrogén hatására indukálódhatnak.

4.5.2. Nikkelfüggés

4.5.2.1. Membránkötött hidrogenáz

A nikkell ion koncentráció függésének tanulmányozásával az volt a célom, hogy enzim aktivitásmérésekkel bebizonyítsam, hogy a genomszekvencia alapján tipikus nikkell-vas

hidrogenáz enzim szintézise/aktivitása valóban nikkelfüggő. A baktériumot nikkelfüggő és különböző nikkelfüggő koncentrációjú tápoldatokon növesztetem. A nikkelfüggő növesztés nem volt hatással a baktérium növekedésére, a hidrogenáz aktivitás viszont nikkelfüggést mutatott. A hidrogenáz aktivitást a membránkötött hidrogenázra specifikus metilénkékes hidrogén felvevő aktivitással követtem nyomon. A nikkelfüggő mentes tápoldatot 10 μ M EDTA-val egészítettem ki (27). Az EDTA az alkalmazott koncentrációban nem befolyásolta az enzim aktivitást (12. Ábra).



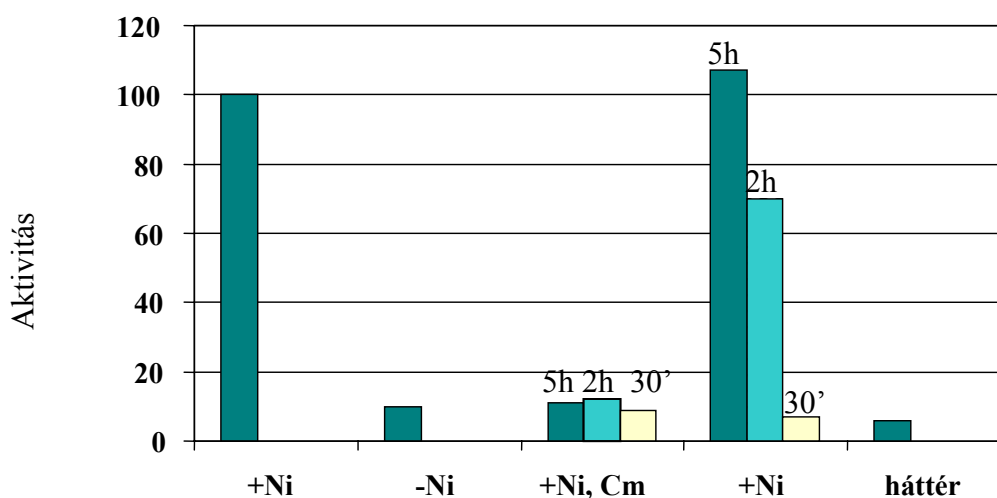
12. Ábra. EDTA kezelés hatása hidrogénfelvevő aktivitásra (e^- akceptor: metilénkék) *M. capsulatus* membrán frakcióban mérve. [Ni]: 8 μ M.

Az eredményekből következik, hogy a membránkötött hidrogénfelvevő aktivitás nikkelfüggő. Annak kiderítésére, hogy a nikkelfüggő ionok az enzim szintéziséhez, vagy csupán a megszintetizálódott fehérje aktiválásához szükségesek, a következő kísérletet végeztem el: A különböző növekedési fázisban levő rázatott kultúrákhoz nikkelfüggő és kloramfenikolt adtam. Az 5. Diagramon a 16 órás növesztés vége előtt fél, 2 és 5 órával a nikkelfüggő és nikkelfüggő + kloramfenikol hozzáadásának membránkötött hidrogenázra gyakorolt hatását követhetjük nyomon.

Az aktivitás 100%-ig helyreáll, ha a nikkelfüggő 5 órával a növesztés vége előtt adtam a kultúrához. Ez azt jelenti, hogy a nikkelfüggő 5 óra alatt képes, vagy beépüléssel vagy

enzimszintézis révén helyreállítani a kontrollnak megfelelő aktivitást. Az aktivitás 70%-a áll helyre 2 órai növesztés után. Fél óra egyértelműen kevés a nikkell beépüléséhez vagy az enzim szintéziséhez. Kloramfenikollal kiegészítve és megismételve a kísérletet, mind a három esetben, gyakorlatilag a nikkell mentes kontrollal megegyező nagyságú aktivitás mérhető.

A kloramfenikol a riboszóma nagy alegységéhez kötődve gátolja a peptidkötés kialakulását, ezáltal blokkolja a fehérjeszintézist (65). Ez azt jelenti, hogy az antibiotikum gátolja a nikkell felvételéhez vagy katalitikus centrumba való beépüléséhez szükséges fehérjék, így a hidrogenáz enzim szintézisét is.



5. Diagram. A nikkell (8mM) és kloramfenikoll (120mM) kezelés hatása a membránkötött hidrogenáz hidrogénfelvevő aktivitására (aktivitás százalékos arányban feltüntetve).

A nikkell tehát nélkülözhetetlen a membránkötött hidrogén felvevő hidrogenáz aktivitáshoz. A vizsgált membránkötött hidrogenáz az enzimaktivitás mérési adatok és a szekvencia adatok alapján is egy [NiFe] típusú hidrogenáz.

4.5.2.2. Szolubilis hidrogenáz aktivitás nikkell függése

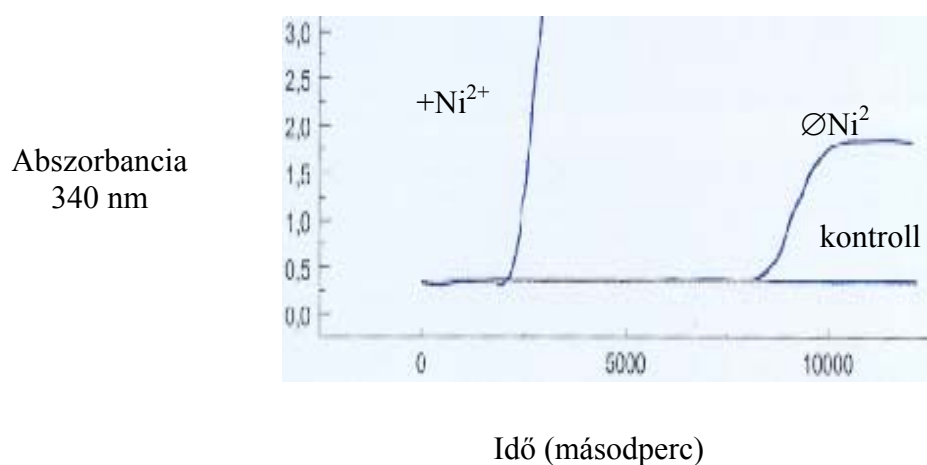
Az enzim aktivitás alapján felfedezett és az aktivitásmérések alapján szolubilis hidrogenáznak azonosított enzim szintéziséhez, működéséhez, a membránkötött hidrogenázhoz hasonlóan, esszenciális a nikkell jelenléte. Az enzimaktivitás nikkell függését NAD^+ -redukáló hidrogén

felvevő aktivitásméréssel mutattam ki. Az aktivitásgörbéből (13. Ábra) leolvasható egy minimális háttéraktivitás (a nikkelt mentes kontroll 10 μ M EDTA hozzáadásával készült). Erre jellemző, hogy a lag fázis minden esetben minimum háromszorosa a nikkelen növesztett baktérium szolubilis frakció aktivitásgörbe lag fázisának. Ennek a jelenségnek is több magyarázata lehet:

A nikkelt mentes tápon nevelt baktériumban mennyiségileg kevesebb hidrogenáz enzim szintetizálódik, ez teljesen logikus, mivel a [NiFe] hidrogenázok aktív centrumának összeszereléséhez, nélkülözhetetlen a Ni²⁺ beépülése (46). (A nikkelt limitált tápban visszamaradt nikkelt szennyeződés lehet a magyarázata a minimális, de mérhető NAD⁺-függő hidrogenáz enzim szintézisének).

Tehát nikkelt hiányában az enzim bioszintézise vagy érése sérül. Kimutatták (Bagyinka Csaba, személyes megbeszélés) hogy az enzimkoncentráció is befolyásolja a lag periódus hosszát.

A másik lehetséges magyarázat a nikkelt stabilizáló hatása.



13. Ábra. Hidrogén felvevő NAD-redukáló hidrogenáz aktivitás. Kontroll: hidrogén gáz mentes minták.

4.5.3. pH optimum meghatározása

Az enzim működés optimális pH-tartományának meghatározása az aktivitásmérések mellett, az enzimsztítás megfelelő paramétereinek kiválasztásához is nélkülözhetetlen. Ebben az

esetben meghatároztam a szolubilis frakció NAD^+ -függő hidrogenáz aktivitását, hidrogén felvevő irányban. A következő pH-n teszteltem a hidrogenáz aktivitást: pH=4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0 és 9,0. Hidrogén felvevő aktivitást kizárólag pH=6,0 és pH=7,0 esetén mutattam ki.

A tisztítás szempontjából fontos tisztázni, hogy az enzim pH hatására történő inaktivációja reverzibilis vagy irreverzibilis. Az enzim nem mutatott hidrogén felvevő aktivitást 50mM HEPES puffer (pH=8,5) esetén. Kontrollnak 25mM MOPS és 50mM HEPES (pH=7,2) puffereket használtam. A pH=8,5 pufferben felvett mérendő mintát tartalmazó elegy pH-ját 30 perces inkubáció után visszaállítottam 7,2-re. A NAD^+ -függő hidrogénfejlesztő aktivitás nem állt helyre, tehát a pH eltolása irreverzibilis enziminaktivációt vált ki. Mivel a szolubilis enzim tisztítása során az enzimet technikai okok miatt a hidrogénfejlesztő aktivitás mérésével célszerűbb követni, a szolubilis frakció hidrogénfejlesztő aktivitásának (elektron donor: NADH) pH függését is meghatároztam (11. Táblázat). A kapott eredmény alapján az enzimmtisztítás során mindvégig pH=6,0-7,2 tartományban kell dolgozni.

Puffer	pH	Hidrogénfejlesztő aktivitás (%)
20mM Citrát-foszfát	4,5	0
	5,5	0
	6,5	97
20mM Kálium-foszfát	5,8	69
	6,1	98
	6,5	95
	7,1	93
50mM Tris-Cl	7,9	60
	8,8	0

11. Táblázat. Szolubilis frakciók pH-függő hidrogénfejlesztő aktivitása.

4.5.4. Hőkezelés

Az enzim aktivitás hőmérséklet függésének, illetve optimumának meghatározása az enzim jellemzése mellett azért is lényeges paraméter, mert felhasználható egyik lépésként a tisztítás

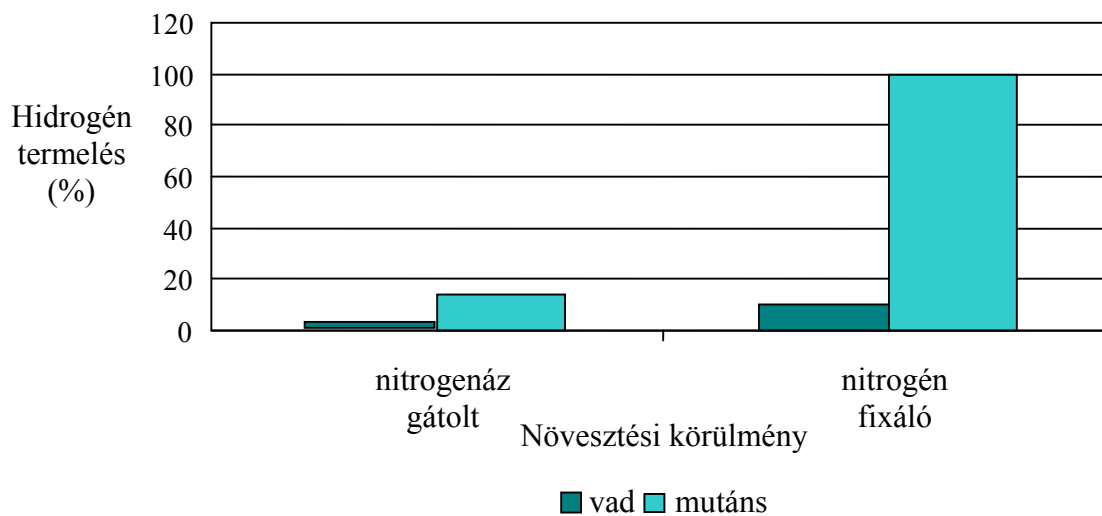
kezdeti fázisában. Hidrogén felvevő irányban a 43°C mellett, szolubilis frakciókkal 50°C és 60°C-on mértem hidrogenáz aktivitást (12. Táblázat).

43°C	50°C	60°C
1,39	1,66	0,78
83,6%	100%	46,8%

12. Táblázat. Hidrogén felvevő aktivitás hőmérséklet függése. Az aktivitások nmol H₂ (perc x mg fehérje)⁻¹ egységben kifejezve.

4.6. Hidrogenázok fiziológiai szerepe

4.6.1. A membránkötött enzim fiziológiai szerepének meghatározása



6. Diagram. A termelődött és gáztérbe jutott hidrogén mennyiségének alakulása *M. capsulatus* (Bath) és *hupSL* mutáns nitrogén fixáló és nitrogenáz gátolt körülmények közötti növesztés során, két napos inkubációt követően.

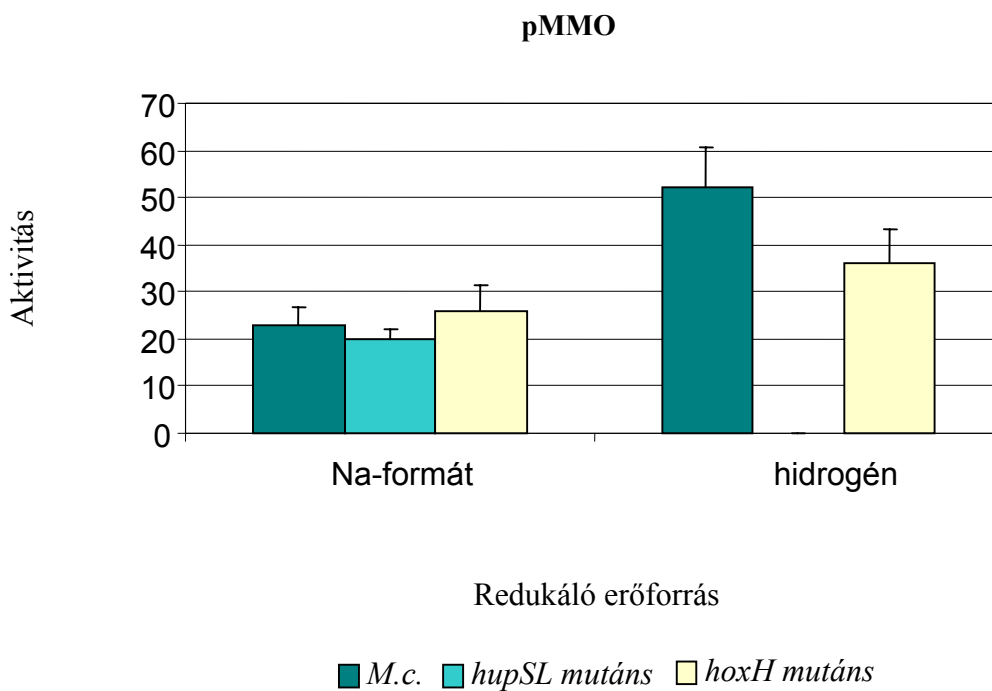
A Hup mutáns törzset különböző, nitrogénfixáló és nitrogénáz gátolt körülmények között növesztettem. Ezt követően vizsgáltam a növesztés során, a rázatva nevelt kultúra légterében termelődött hidrogén mennyiségét. A termelődött hidrogént gázkromatográfiásan analizáltam. A termelődött hidrogén mennyiségéből (6. Diagram) egyértelműen levonható a következtetés, miszerint a membránkött hidrogenáz enzim funkciója a nitrogénáz által termelt hidrogén eloxidálása a sejt számára. Nitrogénáz gátolt körülmények között is tapasztaltunk némi hidrogéntermelést, ami nem származhat a nitrogénáz enzimtől, kivéve, ha a nitrogénáz bioszintézis szabályozása nem tökéletes. A hidrogént egy másik, a baktériumban szintén konstitutívan expresszálódó hidrogenáz enzim (akár a szolubilis hidrogenáz) termelheti. A lehetőségek közötti egyértelmű választásra nincs kísérletes bizonyíték. A tendencia azonban ugyanaz, mint a nitrogén fixáló körülmények között nevelt kultúra esetén. A termelődött hidrogént a Hup hidrogenáz eloxidálja, javítva ezzel a sejt energiaháztartását.

4.6.2. Szolubilis hidrogenáz

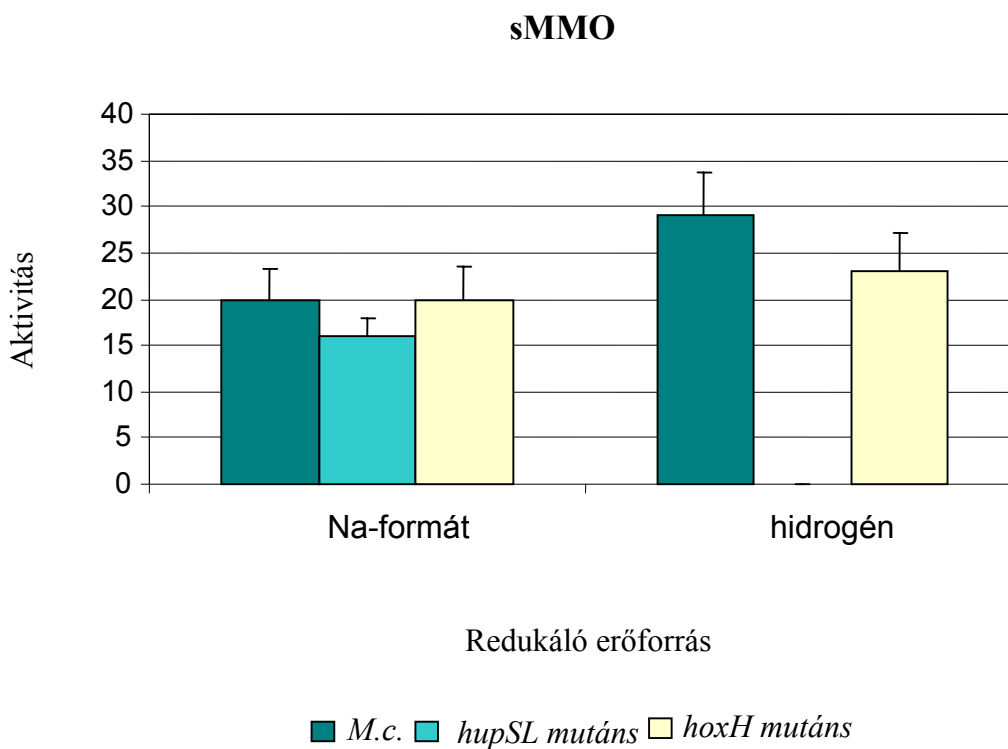
A *hoxH* mutánst különböző körülmények között (nitrogenáz represszált, nitrogénfixáló) növesztve, fenotípusos változást nem tapasztaltam. A mutáns hidrogéntartalmának (gáztér) analizálásával bizonyítottam, hogy a szolubilis hidrogenáz nem vesz részt a nitrogénáz enzim által nitrogén fixáló körülmények között termelt hidrogén eloxidálásában. A formátból kapott egész sejtes hidrogénfejlesztő aktivitások alapján [56. oldal] a szolubilis enzimet esetleg a formát-dehidrogenázzal lehet kapcsolatba hozni. Ennek kiderítéséhez azonban további kísérletekre lenne szükség. Az enzim fiziológiai szerepe jelenleg még nem ismert.

4.6.3. Hidrogenáz, mint redukáló erőforrást biztosító enzim az *in vivo* membránkött és szolubilis metán monooxygenáz aktivitás mérések esetén

Hidrogén hajtott sMMO és pMMO aktivitást is sikerült kimutatni *Methylococcus capsulatus* (Bath) egész sejtben [52. oldal]. Az aktivitások oxigénnel szembeni toleranciát és K_m értékét, hidrogénre nézve, meghatározták, de a két enzim kapcsolatát részletesebben nem tanulmányozták. Későbbi, esetleges gyakorlati alkalmazás szempontjából fontos meghatározni, hogy melyik hidrogenáz enzim biztosítja a szükséges redukált kofaktorokat, esetleg mind a kettő képes a MMO-k redukált kofaktor igényének biztosítására. Ennek érdekében a következő kísérleteket végeztem el:



7. Diagram. Egész sejtes pMMO aktivitás. Az aktivitások nmol propilén ox. (perc x mg fehérje)⁻¹ értékben feltüntetve.



8. Diagram. Egész sejtes sMMO aktivitás. Az aktivitások nmol propilén ox. (perc x mg fehérje)⁻¹ értékben feltüntetve.

Egész sejtes hidrogénnel „hajtott” metán monooxygenáz aktivitásokat mértem a *hupSL* és *hoxH* mutánsokkal (7. és 8. Diagramok). Kontrollként redukált kofaktorként minden esetben Na-formátot használtam. Az aktivitásmérések alapján mindkét metán monooxygenáznál azonos tendenciájú eredményt kaptam. A *hupSL* mutánsban sem pMMO, sem sMMO esetén nem detektálható H₂-hajtott metán monooxygenáz aktivitás. A szolubilis hidrogenáz mutáns esetén nem tapasztaltam szignifikáns eltérést a kontrollhoz képest. A hidrogén hajtott pMMO aktivitások esetén a Hup típusú, membránkötött hidrogenáz enzim szolgáltatja a redukáló erőforrást, a szolubilis hidrogenáz (Hox), az aktivitás mérések alapján nem játszik szerepet a reakcióban. Rézmentes körülmények között az sMMO mellett jelen van egy bazális pMMO aktivitás is. A mért hidrogénhajtott MMO aktivitások eredetének kiderítéséhez szükség van egy inhibitorra, amely szelektíven gátolja a szolubilis vagy a membránkötött metán monooxygenázt. További kísérletek szükségesek tehát annak eldöntésére, hogy az sMMO is a membránkötött hidrogenázzal működik együtt vagy sem.

Az, hogy a hidrogenáz és a metán monooxygenáz enzimek milyen molekuláris mechanizmus szerint működnek együtt, még szintén nem ismert. Természetesen további, biokémiai vizsgálatok, valamint a tiszta enzimekkel végzett *in vitro* kísérletek szükségesek a struktúrával, működéssel kapcsolatos kérdések megválaszolásához.

5. Összefoglalás

A Földön keletkező metán, az atmoszférába kerülve komoly szerepet játszik az üvegházhatás kialakításában. A metanotrófok a keletkező metán jelentős részét eloxidálják, mielőtt az az atmoszférába kerülne, ezért rendkívül fontosak a légköri metán koncentráció mérséklésében.

A Föld fosszilis metán készletei a kőolaj készletekkel összemérhető nagyságúak, hasznosításuk azonban nehezebb, mert a metán térfogategységre számított energiasűrűsége kisebb. Ezért ma még óriási mennyiségű földgázt engednek el kihasználatlanul a világon. Ezt az energiamennyiséget is többszörösen meghaladja a megújuló, biológiai rendszerek által termelt metán mennyisége. A legtöbb gyakorlati nehézség abból adódik, hogy a különböző forrásokból származó metán tárolása, szállítása költséges és veszélyes. Ezért gazdaságos felhasználási lehetőségei korlátozottak. Ha a metánt metanollá alakítják, ez a gond megszűnne: a metanol szállítása jóval egyszerűbb.

A metanotrófok másik jelentős felhasználási területe a szennyezőanyagok, elsősorban halogénezett és aromás szénhidrogén származékok biológiai úton történő lebontása. Metán monooxigenáz enzimükkel bontják le a különböző toxikus vegyületeket. Gyakorlati alkalmazás esetén redukáló erőforrásra van szükség az enzim működéséhez. A baktérium hidrogenáz enzimeit, megfelelő kofaktorok redukálásán keresztül alternatív redukáló erőforrást biztosíthatnak a MMO-k számára.

A dolgozatban leírt új tudományos eredményeket az alábbiakban foglalom össze:

- Membránkötött hidrogenáz aktivitást detektáltam *Methylococcus capsulatus* (Bath)-ban nitrogénfixáló és nitrogénáz gátolt növekedési körülmények között egyaránt.
- A létrehozott membránkötött hidrogenáz mutáns segítségével meghatároztam az enzim fiziológiai szerepét a baktériumban.
- Enzimaktivitás mérésekkel igazoltam egy új típusú, NAD^+ -függő, szolubilis hidrogenáz enzim jelenlétét a baktériumban.
- A szolubilis, NAD^+ -függő hidrogenáz géneket azonosítottam a genomban. *Methylococcus capsulatus* NAD^+ -függő szolubilis hidrogenáza legközelebbi rokonságot *Ralstonia eutropha* H16 törzs szolubilis NAD^+ -redukáló hidrogenázával mutat.

- Ugyancsak markercserés mutangenezissel, kétszeres rekombinánsokra szelektálva *hoxH* mutánst hoztunk létre. Szolubilis hidrogenáz mutáns törzsben a hidrogenáz aktivitás hiánya nem eredményezett fenotípusos változást.
- Meghatároztam a szolubilis enzim - az enzimmtisztítás szempontjából fontos - alapvető biofizikai és biokémiai jellemzőit.
- Igazoltam, hogy az *in vivo* hidrogén-hajtott pMMO aktivitások esetén nélkülözhetetlen a membránkött hidrogenáz jelenléte. A szolubilis hidrogenáz aktivitás hiányában azonban továbbra is mérhető hidrogén hajtott sMMO és pMMO aktivitás.
- Kimutattam, hogy a membránkött hidrogenáz gének elterjedtek a metanotróf baktériumok körében.

6. Hivatkozások jegyzéke

1. **Adams M.W.W.** 1990. The structure and mechanism of iron-hydrogenases. *Biochim.Biophys.Acta*.
2. **Adams, M. W., L. E. Mortenson, and J. S. Chen.** 1980. Hydrogenase. *Biochim.Biophys.Acta* **594**:105-176.
3. **Albrecht S.L., Maier R.J., Hanus R.J., Russell S.A., Emerich D.W., and Evans H.J.** 1979. Hydrogenase in *Rhizobium japonicum* increases nitrogen fixation by nodulated soybeans. *Science* 1255-1257.
4. **Aragno M. and Schlegel H.G.** 1981. The hydrogen-oxidizing bacteria, p. 865-893. *In Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.*
5. **Axley, M. J., D. A. Grahame, and T. C. Stadtman.** 1990. Escherichia coli formate-hydrogen lyase. Purification and properties of the selenium-dependent formate dehydrogenase component. *J.Biol.Chem.* **265**:18213-18218.
6. **Bagyinka, C., N. A. Zorin, and K. L. Kovacs.** 1984. Unconsidered factors affecting hydrogenase activity measurement. *Anal.Biochem.* **142**:7-15.
7. **Basu, P., B. Katterle, K. K. Andersson, and H. Dalton.** 2003. The membrane-associated form of methane mono-oxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath) is a copper/iron protein. *Biochem.J.* **369**:417-427.
8. **Bernhard, M., T. Buhrke, B. Bleijlevens, A. L. De Lacey, V. M. Fernandez, S. P. Albracht, and B. Friedrich.** 2001. The H₂ sensor of *Ralstonia eutropha*. Biochemical characteristics, spectroscopic properties, and its interaction with a histidine protein kinase. *J.Biol.Chem.* **276**:15592-15597.
9. **Bothe, H., J. K. Moller, A. Mergel, J. Larsen, C. Jorgensen, H. Bothe, and L. Jorgensen.** 2002. Heterotrophic bacteria growing in association with *Methylococcus*

capsulatus (Bath) in a single cell protein production process.

Appl.Microbiol.Biotechnol. **59**:33-39.

10. **Brown L.R., Strawinski R.J., and McCleskey C.S.** 1964. The isolation and characterization of *Methanomonas methanooxidans* Brown and Strawinski. Can.J.Microbiol **10**:791-800.
11. **Bryant, F. O. and M. W. Adams.** 1989. Characterization of hydrogenase from the hyperthermophilic archaeobacterium, *Pyrococcus furiosus*. J.Biol.Chem. **264**:5070-5079.
12. **Burrows K.J., Kornish A., Scott D., and Higgins I.J.** 1984. Substrate specificities of the soluble and particulate methane monooxygenase of *Methylosinus trichosporium* OB3b. Gen.Microbiol **130**:3327-3333.
13. **Buurman, G., S. Shima, and R. K. Thauer.** 2000. The metal-free hydrogenase from methanogenic archaea: evidence for a bound cofactor. FEBS Lett. **485**:200-204.
14. **Cammack R., Frey M., and Robson R.** 2001. Hydrogen as a fuel. Taylor and Francis, London and New York.
15. **Chen, J. S. and L. E. Mortenson.** 1974. Purification and properties of hydrogenase from *Clostridium pasteurianum* W5. Biochim.Biophys.Acta **371**:283-298.
16. **Chen, Y. P. and D. C. Yoch.** 1987. Regulation of two nickel-requiring (inducible and constitutive) hydrogenases and their coupling to nitrogenase in *Methylosinus trichosporium* OB3b. J.Bacteriol. **169**:4778-4783.
17. **Colby, J. and H. Dalton.** 1978. Resolution of the methane mono-oxygenase of *Methylococcus capsulatus* (Bath) into three components. Purification and properties of component C, a flavoprotein. Biochem.J. **171**:461-468.

18. **Colby, J. and H. Dalton.** 1979. Characterization of the second prosthetic group of the flavoenzyme NADH-acceptor reductase (component C) of the methane mono-oxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath). *Biochem.J.* **177**:903-908.
19. **Csaki, R., T. Hanczar, L. Bodrossy, J. C. Murrell, and K. L. Kovacs.** 2001. Molecular characterization of structural genes coding for a membrane bound hydrogenase in *Methylococcus capsulatus* (Bath). *FEMS Microbiol.Lett.* **205**:203-207.
20. **Dalton H. and Murrell J.C.** 1992. Methane and Methanol Utilizers, *In* Plenum Press, New York.
21. **Dickinson R.E. and Cicerone R.J.** 1986. Future global warming from atmospheric trace gases. *Nature* **319**:109-115.
22. **Eitinger, T., L. Wolfram, O. Degen, and C. Anthon.** 1997. A Ni²⁺ binding motif is the basis of high affinity transport of the *Alcaligenes eutrophus* nickel permease. *J.Biol.Chem.* **272**:17139-17144.
23. **Elsen, S., A. Colbeau, J. Chabert, and P. M. Vignais.** 1996. The hupTUV operon is involved in negative control of hydrogenase synthesis in *Rhodobacter capsulatus*. *J.Bacteriol.* **178**:5174-5181.
24. **Ferry, J. G.** 1997. Methane: small molecule, big impact. *Science* **278**:1413-1414.
25. **Fliermans C.B., Phelps T.J., Ringleberg D., Miksell A.T., and White D.C.** 1988. Mineralization of trichloroethylene by heterotrophic cultures. *Appl.Environ.Microbiol.* **54**:1709-1714.
26. **Fox B.G., Froland W.A., Dege J.E., and Lipscomb J.D.** 1989. Methane monooxygenase from *Methylosinus trichosporium* OB3b-purification and properties of a 3 component system with high specific activity from a type II methanotroph. *J.Biol.Chem.* **264**:10023-10033.

27. **Friedrich, B., E. Heine, A. Finck, and C. G. Friedrich.** 1981. Nickel requirement for active hydrogenase formation in *Alcaligenes eutrophus*. *J.Bacteriol.* **145**:1144-1149.
28. **Friedrich, B. and E. Schwartz.** 1993. Molecular biology of hydrogen utilization in aerobic chemolithotrophs. *Annu.Rev.Microbiol.* **47**:351-383.
29. **Froland, W. A., K. K. Andersson, S. K. Lee, Y. Liu, and J. D. Lipscomb.** 1992. Methane monooxygenase component B and reductase alter the regioselectivity of the hydroxylase component-catalyzed reactions. A novel role for protein-protein interactions in an oxygenase mechanism. *J.Biol.Chem.* **267**:17588-17597.
30. **Garcin, E., X. Vernede, E. C. Hatchikian, A. Volbeda, M. Frey, and J. C. Fontecilla-Camps.** 1999. The crystal structure of a reduced [NiFeSe] hydrogenase provides an image of the activated catalytic center. *Structure.Fold.Des* **7**:557-566.
31. **Geiger W. and Moner-Kubica E.** 1977. Tetrachloroethylene in contaminated ground and drinking waters. *Bull.EnvIRON.Contam.Toxicol.* **19**:475-580.
32. **Green, J. and H. Dalton.** 1985. Protein B of soluble methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath). A novel regulatory protein of enzyme activity. *J.Biol.Chem.* **260**:15795-15801.
33. **Green, J. and H. Dalton.** 1988. The biosynthesis and assembly of protein A of soluble methane monooxygenase of *Methylococcus capsulatus* (Bath). *J.Biol.Chem.* **263**:17561-17565.
34. **Green, J., S. D. Prior, and H. Dalton.** 1985. Copper ions as inhibitors of protein C of soluble methane monooxygenase of *Methylococcus capsulatus* (Bath). *Eur.J.Biochem.* **153**:137-144.
35. **Grosse, S., L. Laramée, K. D. Wendlandt, I. R. McDonald, C. B. Miguez, and H. P. Kleber.** 1999. Purification and characterization of the soluble methane monooxygenase of the type II methanotrophic bacterium *Methylocystis* sp. strain WI 14. *Appl.EnvIRON.Microbiol.* **65**:3929-3935.

36. **Grzeszik, C., M. Lubbers, M. Reh, and H. G. Schlegel.** 1997. Genes encoding the NAD-reducing hydrogenase of *Rhodococcus opacus* MR11. *Microbiology* **143 (Pt 4)**:1271-1286.
37. **Hanczar, T., R. Csaki, L. Bodrossy, J. C. Murrell, and K. L. Kovacs.** 2002. Detection and localization of two hydrogenases in *Methylococcus capsulatus* (Bath) and their potential role in methane metabolism. *Arch.Microbiol.* **177**:167-172.
38. **Hanson, R. S. and T. E. Hanson.** 1996. Methanotrophic bacteria. *Microbiol.Rev.* **60**:439-471.
39. **Hogan K.B., Hoffman J.S., and Thompson A.M.** 1991. Methane on the greenhouse agenda. *Nature* **354**:181-182.
40. **Inoue, H., H. Nojima, and H. Okayama.** 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**:23-28.
41. **Jacobi, A., R. Rossmann, and A. Bock.** 1992. The hyp operon gene products are required for the maturation of catalytically active hydrogenase isoenzymes in *Escherichia coli*. *Arch.Microbiol.* **158**:444-451.
42. **Kawamura S., O'Neil J.G., and Wilkinson J.F.** 1982. Hydrogen production by methylotrophs under anaerobic conditions. *J.Ferment.Technol.* **61**:151-156.
43. **Kessler, E.** 1973. Effect of anaerobiosis on photosynthetic reactions and nitrogen metabolism of algae with and without hydrogenase. *Arch.Mikrobiol.* **93**:91-100.
44. **Lemos, S. S., M. L. Perille Collins, S. S. Eaton, G. R. Eaton, and W. E. Antholine.** 2000. Comparison of EPR-visible Cu(2+) sites in pMMO from *Methylococcus capsulatus* (Bath) and *Methylomicrobium album* BG8. *Biophys.J.* **79**:1085-1094.
45. **Lutz, S., A. Jacobi, V. Schlensog, R. Bohm, G. Sawers, and A. Bock.** 1991. Molecular characterization of an operon (hyp) necessary for the activity of the three hydrogenase isoenzymes in *Escherichia coli*. *Mol.Microbiol.* **5**:123-135.

46. **Maier, T. and A. Bock.** 1996. Generation of active [NiFe] hydrogenase in vitro from a nickel-free precursor form. *Biochemistry* **35**:10089-10093.
47. **Malki, S., I. Saimmaime, G. De Luca, M. Rousset, Z. Dermoun, and J. P. Belaich.** 1995. Characterization of an operon encoding an NADP-reducing hydrogenase in *Desulfovibrio fructosovorans*. *J.Bacteriol.* **177**:2628-2636.
48. **Massanz, C., S. Schmidt, and B. Friedrich.** 1998. Subforms and in vitro reconstitution of the NAD-reducing hydrogenase of *Alcaligenes eutrophus*. *J.Bacteriol.* **180**:1023-1029.
49. **Meyer, J. and J. Gagnon.** 1991. Primary structure of hydrogenase I from *Clostridium pasteurianum*. *Biochemistry* **30**:9697-9704.
50. **Meyer, O. and H. G. Schlegel.** 1980. Carbon monoxide:methylene blue oxidoreductase from *Pseudomonas carboxydovorans*. *J.Bacteriol.* **141**:74-80.
51. **Murrell J.C. and Dalton H.** 1983. Nitrogen fixation in obligate methanotrophs. *J.Gen.Microbiol.* **129**:3481-3486.
52. **Murrell J.C. and Kelly D.P.** 1993. *Microbial Growth on C1 Compounds*. Intercept Ltd.
53. **Nakajima T., Uchiyama H., Yagi, and N. T.** 1992. Purification and properties of a soluble methane monooxygenase from *Methylocystis* strain M. *Biosci.Biotech.Biochem.* **56**:736-740.
54. **Nguyen H.H.T, Nakagawa K.H., Hedman B., Elliott S.J., Lidstrom M.E., Hodgson K.O., and Chan S.I.** 1996. X-ray absorption and EPR studies on the copper ions associated with the particulate methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath). Cu(I) ions and their implications. *J.Am.Chem.Soc.* **118**:12766-12776.

55. **O'Connell, K. L. and J. T. Stults.** 1997. Identification of mouse liver proteins on two-dimensional electrophoresis gels by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of in situ enzymatic digests. *Electrophoresis* **18**:349-359.
56. **Patel R.N.** 1984. Methane monooxygenase from *Methylobacterium* sp. strain CRL-26., p. 83-90. *In* Am. Soc. Microbiology. Washington D.C.
57. **Patel, R. N. and J. C. Savas.** 1987. Purification and properties of the hydroxylase component of methane monooxygenase. *J.Bacteriol.* **169**:2313-2317.
58. **Peters, J. W., W. N. Lanzilotta, B. J. Lemon, and L. C. Seefeldt.** 1998. X-ray crystal structure of the Fe-only hydrogenase (CpI) from *Clostridium pasteurianum* to 1.8 angstrom resolution. *Science* **282**:1853-1858.
59. **Pilkington S.J. and Dalton H.** 1991. Purification and characterization of the soluble methane monooxygenase from *Methylosinus sporium* 5 demonstrates the highly conserved nature of this enzyme in methanotrophs. *FEMS Lett* **78**:101-108.
60. **Pilkington, S. J., J. M. Skehel, R. B. Gennis, and J. E. Walker.** 1991. Relationship between mitochondrial NADH-ubiquinone reductase and a bacterial NAD-reducing hydrogenase. *Biochemistry* **30**:2166-2175.
61. **Porthun, A., M. Bernhard, and B. Friedrich.** 2002. Expression of a functional NAD-reducing [NiFe] hydrogenase from the gram-positive *Rhodococcus opacus* in the gram-negative *Ralstonia eutropha*. *Arch.Microbiol* **177**:159-166.
62. **Rakhely, G., Z. H. Zhou, M. W. Adams, and K. L. Kovacs.** 1999. Biochemical and molecular characterization of the [NiFe] hydrogenase from the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus litoralis*. *Eur.J.Biochem.* **266**:1158-1165.
63. **Reeve, J. N., J. Nolling, R. M. Morgan, and D. R. Smith.** 1997. Methanogenesis: genes, genomes, and who's on first? *J.Bacteriol.* **179**:5975-5986.

64. **Rosenzweig, A. C., C. A. Frederick, S. J. Lippard, and P. Nordlund.** 1993. Crystal structure of a bacterial non-haem iron hydroxylase that catalyses the biological oxidation of methane. *Nature* **366**:537-543.
65. **Salyers A.A. and Whitt D.D.** 2001. *Microbiology: diversity, disease, and the environment.* Fitzgerald Science Press, Inc.
66. **Sambrook J., Fritsch E.F., and Maniatis T.** 2002. *Molecular Cloning, a Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
67. **Sauter, M., R. Bohm, and A. Bock.** 1992. Mutational analysis of the operon (*hyc*) determining hydrogenase 3 formation in *Escherichia coli*. *Mol.Microbiol.* **6**:1523-1532.
68. **Schagger, H., W. A. Cramer, and G. von Jagow.** 1994. Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal.Biochem.* **217**:220-230.
69. **Schink, B. and H. G. Schlegel.** 1979. The membrane-bound hydrogenase of *Alcaligenes eutrophus*. I. Solubilization, purification, and biochemical properties. *Biochim.Biophys.Acta* **567**:315-324.
70. **Schmitz, O., G. Boison, H. Salzmann, H. Bothe, K. Schutz, S. H. Wang, and T. Happe.** 2002. HoxE--a subunit specific for the pentameric bidirectional hydrogenase complex (HoxEFUYH) of cyanobacteria. *Biochim.Biophys.Acta* **1554**:66-74.
71. **Schneider, K. and H. G. Schlegel.** 1976. Purification and properties of soluble hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus* H 16. *Biochim.Biophys.Acta* **452**:66-80.
72. **Semrau, J. D., A. Chistoserdov, J. Lebron, A. Costello, J. Davagnino, E. Kenna, A. J. Holmes, R. Finch, J. C. Murrell, and M. E. Lidstrom.** 1995. Particulate methane monooxygenase genes in methanotrophs. *J.Bacteriol.* **177**:3071-3079.

73. **Serebryakova L.T., Zorin N.A., and Lindblad P.** 1994. Reversible hydrogenase in *Anabaena variabilis* ATCC 29413. Presence and localization in non N₂-fixing cells. Arch.Microbiol. **161**:140-144.
74. **Shah N.N., Hanna M.L., Jackson K.J., and Taylor R.T.** 1995. Batch cultivation of *Methylosinus trichosporium* OB3b. Production of hydrogen-driven soluble or particulate methane monooxygenase activity. Biotechnol.Bioeng. **45**:229-238.
75. **Sohnngen, N. L.** 1906. Über bakterien, welche methanals kohlenstoffnahrung und energiequelle brauchen. Zent.Bakt.Parasitenk. **15**:513-517.
76. **Stanley S.H., Prior S.D., Leak D.J., and Dalton H.** 1983. Copper stress underlies the fundamental change in intracellular location of methane monooxygenase in methane oxidizing organisms – studies in batch and continuous cultures. Biotech.Lett. **5**:487-492.
77. **Stoylar S., Franke M., and Lindstrom M.E.** 2001. Expression of *Methylococcus capsulatus* Bath Particulate Methane Monooxygenase Genes. J.Bacteriol. **183**:1810-1812.
78. **Takeda, K.** 1988. Characteristics of a nitrogen-fixing methanotroph, Methylocystis T-1. Antonie Van Leeuwenhoek **54**:521-534.
79. **Tran-Betcke, A., U. Warnecke, C. Bocker, C. Zaborosch, and B. Friedrich.** 1990. Cloning and nucleotide sequences of the genes for the subunits of NAD-reducing hydrogenase of *Alcaligenes eutrophus* H16. J.Bacteriol. **172**:2920-2929.
80. **Verhagen, M. F., T. O'Rourke, and M. W. Adams.** 1999. The hyperthermophilic bacterium, *Thermotoga maritima*, contains an unusually complex iron-hydrogenase: amino acid sequence analyses versus biochemical characterization. Biochim.Biophys.Acta **1412**:212-229.
81. **Vignais, P. M., B. Billoud, and J. Meyer.** 2001. Classification and phylogeny of hydrogenases. FEMS Microbiol.Rev. **25**:455-501.

82. **Volbeda, A., M. H. Charon, C. Piras, E. C. Hatchikian, M. Frey, and J. C. Fontecilla-Camps.** 1995. Crystal structure of the nickel-iron hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*. *Nature* **373**:580-587.
83. **Voordouw, G. and S. Brenner.** 1985. Nucleotide sequence of the gene encoding the hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough). *Eur.J.Biochem.* **148**:515-520.
84. **Whittenbury R. and Dalton H.** 1981. The methylotrophic bacteria, p. 894-902. *In* The prokaryotes: a handbook on habitats, isolation, and identification of bacterial bacteria. Springer, Berlin.
85. **Whittenbury R., Phillips K.C., and Wilkinson J.F.** 1970. Enrichment, isolation and some properties methane utilizing bacteria. *J.Gen.Microbiol.* **61**:205-218.
86. **Woodland, M. P. and H. Dalton.** 1984. Purification and characterization of component A of the methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath). *J.Biol.Chem.* **259**:53-59.
87. **Wu, L. F. and M. A. Mandrand.** 1993. Microbial hydrogenases: primary structure, classification, signatures and phylogeny. *FEMS Microbiol.Rev.* **10**:243-269.
88. **Yagi, T., T. Yano, S. Di Bernardo, and A. Matsuno-Yagi.** 1998. Prokaryotic complex I (NDH-1), an overview. *Biochim.Biophys.Acta* **1364**:125-133.
89. **Zirngibl, C., W. Van Dongen, B. Schworer, R. Von Bunau, M. Richter, A. Klein, and R. K. Thauer.** 1992. H₂-forming methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase, a novel type of hydrogenase without iron-sulfur clusters in methanogenic archaea. *Eur.J.Biochem.* **208**:511-520.

A dolgozat témájához szorosan kapcsolódó saját közlemények jegyzéke

T.Hanczár, L. Bodrossy és K.L. Kovács. 1998. Hydrogenase Activity Assays on *Methylococcus capsulatus* (Bath). *Acta Biologica Szegediense.* 43, 75-84.

Bodrossy L., **T.Hanczár**, R.Csáki és K.L.Kovács. 1999. Metánfaló baktériumok. *Élet és Tudomány*. 40, 1254-1256.

Csáki R., **T.Hanczár**, L.Bodrossy, J.C.Murrell és K.L.Kovács. 2001. Molecular characterization of structural genes coding for a membrane bound hydrogenase in *Methylococcus capsulatus* (Bath). *FEMS Microbiol Lett.* 205, 203-207.

T.Hanczár, R.Csáki, L.Bodrossy, J.C.Murrell és K.L.Kovács. 2002. Detection and localisation of two hydrogenases in *Methylococcus capsulatus* (Bath) and their potential role in CH₄ metabolism. *Archives of Microbiology.* 177, 167-172.

Kovács K.L., Cs.Bagyinka, L.Bodrossy, B.Fodor, K.Györfi, **T.Hanczár**, J.Ősz, G.Rákhely, M.Takács, A.Tóth, J.Tusz, Recent advances in biohydrogen research. *European Journal of Physiology*, 439, R81-R83. 2000.

További közlemények

Bodrossy L., I.R.McDonald, **T.Hanczár**, R.Csáki, G.Rákhely, J.C.Murrell, K.L.Kovács, Approaches to broaden the biotechnological potential of thermophilic methanotrophs. Poster presented at the Gordon Conference on the Molecular Basis of Microbial One-Carbon Metabolism, Henniker, New Hampshire, USA, 28 June - 3 July 1998.

T.Hanczár, R.Csáki, L.Bodrossy, J.C.Murrell, K.L.Kovács, Hydrogen metabolism in *Methylococcus capsulatus* (Bath). Poster presented at the 143rd SGM Meeting, Edinburgh, UK, 12-16 April 1999.

T.Hanczár, R.Csáki, L.Bodrossy, J.C.Murrell, K.L.Kovács, Hydrogenases in methanotrophic bacteria. Poster presented at the 13th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, Budapest, Hungary, 30th August – 1st September 1999.

T.Hanczár, R.Csáki, L.Bodrossy, J.C.Murrell, K.L.Kovács, Hydrogen driven methane monooxygenase activities in *Methylococcus capsulatus* (Bath). Poster presented at the 6th

International Conference on the Molecular Biology of Hydrogenases, Berlin, Germany, 5th - 10th August 2000.

R.Csáki., L.Bodrossy, **T.Hanczár**, J.Klem and K.L.Kovács, Improvement and application of molecular biological techniques for the investigation of *Methylococcus capsulatus* (Bath). Poster presented at the Gordon research Conference on Molecular Basis of Microbial One Carbon Metabolism, Connecticut College, New London, USA, 8-13 July 2000.

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

T.Hanczár., R.Csáki, L.Bodrossy, J.Klem, C.J.Murrell, Kornél L. Kovács, Hydrogenases in methanotrophic bacteria. Lecture presented at COST 841 action and IEA Annex 15 Joint Workshop, Szeged, Hungary, 7-12 Sept., 2001.

T.Hanczár, Csáki R., Bodrossy L. , Klem J., C.J. Murrell, Kovács L. K., Hidrogenázok metánfalókban, Lecture presented at Straub Days, MTA SzBK, Szeged, Hungary, 25-30 Nov. 2001.

T.Hanczár, R.Csáki, J.Klem és K.L.Kovács, Detection and localisation of two hydrogenases in *Methylococcus capsulatus* (Bath). Poster presented at the Gordon research Conference on Molecular Basis of Microbial One Carbon Metabolism, Connecticut College, New London, USA, 5-12. July 2002.

T.Hanczár, R.Csáki, J.Klem, L.Bodrossy, J.C.Murrell, and K.L. Kovács, Molecular and biochemical studies of soluble methane monooxygenase and hydrogenases in *Methylococcus capsulatus* (Bath). Lecture presented at Hungarian Society for Microbiology Meeting, Balatonfüred, Hungary, 7-10 Oct. 2002 (in hungarian).

Köszönetnyilvánítás

Köszönetet mondok az MTA Szegedi Biológiai Központ Biofizikai Intézetének és az SZTE Biotechnológiai Tanszékének azért, hogy munkámhoz a feltételeket készségesen biztosították.

Köszönöm témavezetőmnek, Prof. Kovács L. Kornélnak a lehetőséget, hogy egyetemi és Ph.D. éveim alatt irányítása alatt dolgozhattam. Köszönöm értékes szakmai tanácsait, bátorítását és támogatását.

Rendkívül sok segítséget kaptam Dr. Bodrossy Leventétől, aki irányította, lelkes és hasznos tanácsaival segítette munkámat. Köszönöm a dolgozat megírásában nyújtott segítségét.

Köszönöm Dr. Rákhely Gábornak és Dr. Bagyinka Csabának értékes szakmai tanácsaikat.

Hálás vagyok Csáki Róbertnek és Klem Józsefnek a mutáns törzsek elkészítéséért, munkámhoz nyújtott önzetlen segítségükért és kiváló ötleteikért.

Köszönetet mondok a Gázanyagcsere csoport valamennyi munkatársának, akik munkám sikeréhez bármilyen módon hozzájárultak.

Külön köszönet szüleimnek és szeretteimnek, akik tanulmányaim során mindvégig bíztattak és támogattak, akikre mindig számíthattam.

Summary

The release of methane into the atmosphere results in an increased rate of global warming. Methanotrophs oxidise a remarkable amount of methane preventing its release to the atmosphere. Therefore, methanotrophic bacteria are very important in the mitigation of atmospheric methane concentrations.

The fossil supply of methane is commensurable with the supply of the natural gas on Earth. Methane utilisation is more difficult because the density of energy by volume is less than that of natural gas. At present a huge amount of natural gas is released unused, into the atmosphere, yet this amount of energy is much less than the energy gained from methane by biological systems.

The biggest problem is that the storage and transport of methane is very expensive and dangerous. Hence, the economical utilisation of methane is limited. If the methane is converted to methanol this problem can be solved. The transportation of methanol is much easier.

Methanotrophs could play a very important role in biodegradation and biotransformation of pollutants, especially in transformation of halogenated and aromatic compounds. Since biodegradation process using MMO are cooxidation process, alternative ways of supplying reducing power are needed.

A possible alternative is hydrogen. Hydrogenases show considerable potential for biodegradation and biotransformation, utilising the unique catalytic activity of their MMOs.

The following results were obtained:

- Membrane bound hydrogenase enzyme activity was detected in *Methylococcus capsulatus* (Bath) under nitrogen fixing and nitrogen depleted conditions.
- The physiological role of the membrane bound enzyme was determined using a membrane bound hydrogenase mutant strain.

- Existence of a NAD⁺-dependent hydrogenase in the bacterium was detected with activity measurements.
- The structural genes of the NAD⁺-reducing hydrogenase were identified in the genome. The highest similarity values for the *M. capsulatus* putative gene products, HoxF, -U, -Y and -H, were obtained to the corresponding subunits of the soluble hydrogenase from *Ralstonia eutropha*.
- A *hoxH* mutant strain was constructed using marker exchange mutagenesis. The lack of the soluble hydrogenase activity caused no apparent phenotypical change in the bacterium.
- The basic biophysical and biochemical characteristics of the soluble enzyme were determined for future purification processes.
- The activity of the membrane bound hydrogenase was essential for the *in vivo* hydrogen driven MMO activity. Both sMMO and pMMO activities were unaffected in the *hoxH* mutant strain.
- Membrane bound hydrogenase genes are widespread among methanotrophic bacteria.