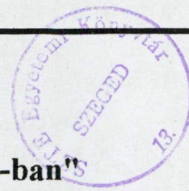


Opponensi vélemény
Hanczár Tímea

"Hidrogenáz enzimek vizsgálata *Methylococcus capsulatus* (Bath)-ban"
című Ph.D. értekezéséről



Hanczár Tímea disszetációja minden szempontból példamutatóan elkészített szakmai anyag. Vonatkozik ez a témaválasztására is, amely a mikrobiális biotechnológia egyik legígéretesebb területéhez, a metánt lebontani képes metanotróf baktériumok gyakorlati-ipari felhasználásához kapcsolódik.

A metán mikrobiális úton történő lebontásának gyakorlati jelentőségét nem lehet eléggé hangsúlyozni. Napjainkban a légkörbe bejutó metán mintegy 60 %-a az emberi tevékenység eredményeként keletkezik és az évente a légkörbe jutó metán mennyisége évente 1%-kal nő. A folyamatok eredményeként a légkör metán tartalma az utóbbi 300 évben több mint kétszeresére nőtt, amely érték a következő évtizedekben kritikus szintre emelkedhet. Tekintve, hogy a metán egyre jelentősebb mértékben járul hozzá a légköri üvegházhatás kialakulásához, igen nagy jelentőségűek azok a kísérletek, amelyek alapkutatási eredményeikkel megalapozzák a metán biológiai úton történő lebontására kifejlesztendő technológiákat. Fontos megemlíteni, hogy ezek a folyamatok alapját képezhetik egy metánból kiinduló metanol termelésnek, így közvetlen gazdasági jelentőségük is lehet.

Nem elhanyagolható továbbá a kutatási téma kapcsolata a környezetvédelemmel. A vizsgált metanotróf baktériumok a metánbontásban kulcsszerepet játszó metán monooxigenázok (elsősorban az úgynevezett szolubilis metán monooxigenázok) révén számos, ma komoly környezeti szennyeződést okozó vegyület (pl. haloalkánok, aromás és heterociklusos szénhidrogének) lebontására is képesek.

A metán monooxigenázok hatékony *in vitro* működtetéséhez szükséges egy olcsó, környezetbarát redukáló komponens. A szerző felvetése szerint a hidrogenáz enzimek által termelt hidrogén ideális erre a célra. Mindezekből kiindulva a szerző a metanotrófok hidrogén anyagcseréjének, a hidrogén metabolizmusban szerepet játszó enzimeknek és a metán és hidrogén anyagcsere közötti kapcsolatnak a molekuláris vizsgálatát tűzte ki céljául.

Egyértelműen kimondható, hogy a Hanczár Tímea által választott kutatási téma időszerű és komoly tudományos érdeklődésre tarthat számot.

A dolgozat szerkezete hagyományos, arányai és felépítése logikus. Az angol összefoglalóval és a saját publikációs jegyzékkel együtt mintegy 92 oldalas disszertáció alapját a szerző önálló kísérleti munkája képezi. Az értekezés összterjedelme mértéktartó, formai és tartalmi szempontból megfelel a doktori iskola által megszabott követelményeknek.

Részletes megjegyzések

Az *Irodalmi áttekintés* rész részletesen ismerteti a metántermelők és metánbontók szerepét, a metanotrófok biotechnológiai hasznosításának lehetőségeit, metanotróf baktériumok típusait, fontosabb nemzetségeit és a metán monooxigenázok fontosabb jellemzőit. Részletesen bemutatja a hidrogenáz enzimeket; ezzel kapcsolatban molekuláris, fiziológiai és filogenetikai vonatkozásokra egyaránt kitér. Az irodalmi áttekintés rendkívül alapos, jól áttekinthető, sőt szépen illusztrált, tükrözi a szerző kellő jártasságát a tématerületen.

Kísérleti munkája során a szerző elsősorban különböző molekuláris biológiai, mikrobiológiai és enzimológiai kísérleti módszereket alkalmazott. Az *Anyagok és módszerek* részben ezek érthetően, jól áttekinthetően és kellő részletességgel kerültek bemutatásra.

A jelölt az *Eredmények és értékelésük* részben közel 25 oldalon át mutatja be a kísérleti munkája során elért eredményeit, illetve az ezek alapján levont következtetéseket. Az elvégzett munka átgondolt rendszert alkot: a kapott eredményeket megfelelő módon dolgozta fel és logikusan tervezte meg a továbblépéshez szükséges újabb kísérleteket.

A jelölt új tudományos eredményei a következők:

- 1/ Membránkötött hidrogenáz aktivitást mutatott ki *Methylococcus capsulatus* -ban nitrogénkötés és ennek gátlása mellett egyaránt.
- 2/ Egy membránkötött hidrogenáz mutánszt hozott létre és ennek felhasználásával tanulmányozta az enzim fiziológiai szerepét.
- 3/ Igazolta egy új típusú, NAD^+ -függő, szolubilis hidrogenáz enzim jelenlétét a baktériumban.
- 4/ *In silico* analízissel szolubilis, NAD^+ -függő hidrogenáz géneket azonosított a genomban.
- 5/ Szolubilis hidrogenáz mutánszt hozott létre markercserés mutagenézissel és vizsgálta a mutáció következményeit.
- 6/ Enzimsztíttással összefüggésben meghatározta a szolubilis NAD^+ -függő hidrogenáz alapvető biokémiai és biofizikai jellemzőit.
- 7/ Igazolta, hogy a membránkötött hidrogenáz működése nélkülözhetetlen az *in vivo* hidrogén-hajtotta partikuláris metán monooxygenáz aktivitások esetén.
- 8/ Vizsgálta a membránkötött hidrogenáz gének elterjedtségét a metanotrófok között.

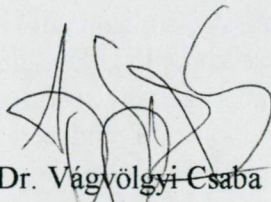
Az eredmények ismeretében megállapítható, hogy a disszertáció elején ismertetett célkitűzések maradéktalanul teljesültek.

A dolgozattal kapcsolatban a következő kérdések megválaszolását kérem a jelölttől:

- 1/ A hidrogén és metán anyagcsere közötti kapcsolat vizsgálatánál a jelölt azt írja, miszerint a maximális sMMO és pMMO aktivitást 10% gáztérbe juttatott hidrogén esetén mérte. A formát és hidrogén hajtotta MMO aktivitások összehasonlítását ugyanakkor 50% hidrogén mellett mért értékekkel közli (51. oldal). Mi ennek az oka?
- 2/ Egész sejtes rendszerekben végzett hidrogenáz enzim aktivitásmérések során, metilénkéket használva elektronakzeptorként gyenge aktivitást detektált. Triton X-100 detergens kezelés hatására az aktivitás szignifikánsan megnőtt. A kísérlet eredményeit az 1. diagram mutatja be, amelyből kitűnik, hogy a Triton X-100 koncentrációt 10%-tól 0.1%-ig folyamatosan csökkentve egyre nagyobb aktivitás értékeket mért. Mi alapján határozta meg a jelölt a kísérletben alkalmazott legalacsonyabb detergens koncentrációt, tekintve, hogy ehhez társul a legnagyobb mért aktivitás?
- 3/ A dolgozat említést tesz eukariótákban előforduló hidrogenázokról is. A szakirodalom alapján kérem, hogy a jelölt ismertesse, hogy milyen eukariótákban bizonyított hidrogenázok megléte, illetve melyek azok az esetek amelyekben az eddig közölt adatok alapján ez kizárható? Mennyiben térnek el szekvenciahomológia, felépítés és funkció alapján ezek az enzimek a különböző prokarióta hidrogenázoktól?

A disszertáció formai és tartalmi szempontból is példaértékű összeállítás. Lényeges kritikai észrevételt nem tudok vele kapcsolatban megfogalmazni. Mindezek alapján a PhD dolgozat nyilvános vitára való bocsátását és a PhD fokozat odaítélését messzemenően támogatom.

Szeged, 2003. május 12.


Dr. Vágölgői Csaba
egyetemi docens

Hanczár Timea

„Hidrogenáz enzimek vizsgálata *Methylococcus capsulatus* (Bath)-ban”

c. doktori értekezésének opponensi véleményezése.



A jelölt témaválasztása rendkívül időszerű és a biotechnológiai alap kutatások szempontjából nagyon fontos részterületet érint. A hidrogenázok nagyon fontos szerepet játszanak nemcsak in vivo az élő sejtekben, de az adott mikroorganizmusok jelentősek a légkörbe jutott metán káros hatásainak csökkentésében és pl. a klórozott szénhidrogénnel szennyezett vizek tisztításában is. Sőt a szerves biomasszából termelt biogáz segítségükkel metanollá is alakítható és ezáltal egy kellemesebb, mobilis motorhajtó üzemanyag nyerhető.

A dolgozat szerkezete megfelel a szokásos követelményeknek, így tartalmaz:

- 1 oldal Bevezető-t,
- 29 oldal Irodalmi áttekintés-t,
- 1 oldal Célkitűzések-et,
- 13 oldal Anyagok és módszerek fejezetet,
- 25 oldal Eredmények és értékelésük fejezetet és
- másfél oldal Összefoglalást.

A dolgozatot kiegészíti a Rövidítések jegyzéke, az angol nyelvű összefoglaló és a 89 publikációt magába foglaló Hivatkozások jegyzéke, ill. saját publikációinak jegyzéke. Az egyes fejezetek arányosnak tekinthetők, felépítésük logikus.

Az irodalmi áttekintés tartalmazza a témakör ismeretanyagát a kezdetektől egészen 2003-ig. A feldolgozás színvonala bizonyítja a jelölt elméleti felkészültségét a nem mindennapi bonyolultságú területeken is. Különösen demonstratívak a pMMO és sMMO szerkezetét bemutató színes ábrák. A célkitűzései világosak, célratörőek.

A választott mikrobaszaporítási módszerek, az alkalmazott elválasztási módszerek, a használt mérési és vizsgálati módszerek a legmodernebbek az adott tématerületen. Talán csak az hiányolható, hogy nem találtam a módszerek között a nitrogén fixáló és nitrogenáz gátló körülmények közötti szaporítás leírását.

Az eredmények bemutatása korrekt, de meggyőzőbb lett volna, ha a néhány táblázat feliratában szereplő 3 párhuzamos mérésből számolt átlagérték mellett a szórás mértéke is szerepelt volna. A megemlítesen túl jó lett volna a dolgozatban is szerepeltetni a pMMO szekvenálásának eredményeit is. Az eredmények értékelése a legtöbb esetben nagyon szűkszavú. Hiányolom, hogy más hidrogenázokkal csak ritkán hasonlítja össze saját

eredményeit. Máskor meg nem magyaráz anomális viselkedést, pl. miért lett nagyobb a hidrogénfejlés a nitrogén gátlása esetén (4. diagram).

A dolgozat nyelvezete, stílusa jó, csak néhány kisebb kifogás említhető, pl. nem tartom helyesnek az alábbi kifejezéseket : beazonosított, megszintetizálódott, eloxidálás stb. Azt is furcsának találom, hogy az angol „format” kifejezést használja magyar szöveg-környezetben is, pl. a formát-dehidrogénáz esetében. Tudomásom szerint a magyar kémiai helyesírás a hangyasav sóit, vagy ionos formáját formiát alakban használja.

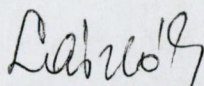
A jelölt publikációs tevékenysége összhangban van az egyetem doktori szabályzatával. Két első szerzős publikációja van, az egyik jó IF-fel rendelkező külföldi folyóiratban jelent meg. Ezenkívül két nívós külföldi folyóiratban megjelent publikációban 2. ill. 6. szerzőként szerepel. A társszerzők minden esetben hozzájárultak ahhoz, hogy ezeket sajátjaként használja fel a disszertációjában. Konferenciákon tartott előadásai között is szerepel első szerzőként, ugyanez vonatkozik a bemutatott poszterekre is.

A tézisekben összefoglalt új tudományos eredményeit elfogadom a sorrendben 6. kivételével, amely nagyon általános. E helyett javaslom a következőt. Meghatároztam a szolubilis enzimmel katalizált reakció pH- és hőmérséklet- függését, amelyek a folyamatban lévő enzimtisztítás szempontjából fontosak.

A felsorolt észrevételek nem csökkentik az elvégzett nagyszámú kísérlet és a kapott eredmények értékét, ezért **a dolgozat nyilvános védésre bocsátását javaslom és eredményes védés esetén a doktori fokozat odaítélését támogatom.**

A dolgozathoz csatolt angol nyelvű összefoglalót, téziseket elfogadom, a mellékelt publikációk fontosak voltak az összkép kialakításában.

Budapest, 2003. május 5.



Dr. László Elemér

kém.tud.doktora, ny.egy.tanár