

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

BEVEZETÉS

A metán szerves anyagok anaerob lebomlása során keletkező, a föld légterében legnagyobb mennyiségben előforduló, legstabilabb szerves gáz. Az atmoszférába jutva a globális felmelegedés mértékének növekedését eredményezi, valamint megváltoztatja az atmoszféra kémiai összetételét. A légkörbe jutó metán ezen kívül megzavarja a troposzféra hidroxilgyök- és ózonháztartását.

Ma a metánkibocsátás 60%-a az ember tevékenységéhez kapcsolódik és ennek mértéke évről évre fokozódik.

A metanotróf baktériumok páratlanok azt a tulajdonságukat illetően, hogy képesek a metánt kizárólagos szén- és energiaforrásként hasznosítani. A metánt széndioxiddá oxidálják metanol, formaldehid és hangyasav köztitermékeken keresztül. A metanotrófok széles körben elterjedtek a természetben és fontos szerepet töltenek be a szénkörforgalomban. Metánfogyasztásuk révén csökkentik a levegőbe jutó metán mennyiségét. Az oxidáció első lépését egy a metanotrófokra jellemző enzim, a metán monooxigenáz katalizálja.

Széles (környezetvédelmi) biotechnológiai felhasználási lehetőségük miatt a metanotrófok gyakorlati jelentősége figyelemre méltó. Világszerte súlyos környezetvédelmi problémát jelentenek napjainkban a természetben felhalmozódó toxikus kémiai vegyületek. E vegyületek nagy csoportját képezik a halogénezett szénhidrogének. A legelterjedtebben használt klórozott szerves oldószer a triklóretilén (TCE). Toxicitásuk és karcinogén hatásuk miatt a TCE és más klórozott szénhidrogének jelenléte ivóvizeinkben komoly egészségkárosító hatást fejtenek ki az emberi szervezetre.

Anaerob és aerob baktériumok is képesek a TCE lassú lebontására, de a nem teljes lebontás eredménye gyakran a TCE-nél még karcinogénebb vinil-klorid. Az obligát metanotrófok, habár növekedésükhöz metánt igényelnek, más egyszerű metán analógokat, valamint nagyobb szerves molekulákat is képesek oxidálni. A tesztelt metanotrófok közül azok bontják jelentős mennyiségben a halogénezett szénhidrogéneket, amelyek citoplazmában lokalizált MMO enzimrendszert tartalmaznak.

A MMO enzimrendszer egy mol redukált ekvivalenst igényel az általa katalizált oxidációs reakcióhoz. Fiziológiai körülmények között ez a redukáló erő részben regenerálódik. *In vitro* körülmények között szükség van egy környezetvédelmi szempontból is megfelelő redukáló forrásra.

A hidrogén egy ígéretes alternatív redukáló forrása a metán monooxygenázoknak. Olcsó, nem környezetszennyező szubsztrát, amit a hidrogenáz enzim oxidál, ezáltal képes regenerálni olyan intracelluláris ekvivalenst is, mint a NADH.

CÉLKITŰZÉSEK

A metán monooxigenáz enzimek egyedülálló katalitikus aktivitásuk révén számos közeljövőben kifejlesztendő környezetkímélő és gazdaságos biotechnológiai eljárás lehetséges katalizátorai. *In vitro* működésükhöz azonban szükség van egy olcsó, környezetbarát redukáló erőforrásra. A hidrogenáz enzimek által termelt hidrogén egy ideális jelölt erre a célra.

A *Methylococcus capsulatus* (Bath) termofil metanotróf baktérium az egyik legalaposabban tanulmányozott metanotróf, ezért választottuk munkánk célpontjává.

Munkám során célul tűztem ki a hidrogenáz enzimek tanulmányozását, elsősorban fehérje szintű jellemzését, melyet az alábbi pontokban foglalok össze:

- A baktérium hidrogenáz enzimeinek kimutatása
- Hidrogenáz aktivitásmérések optimalizálása *Methylococcus capsulatus* (Bath)-ban
- Az enzimek lokalizációjának vizsgálata
- A Hox típusú szolubilis hidrogenáz enzim struktúrgénjeinek azonosítása
- Membránkötött hidrogenáz struktúrgének keresése metanotrófokban
- A szolubilis hidrogenáz enzim biokémiai jellemzése
- A hidrogenáz enzimek funkciójának meghatározása

MÓDSZEREK

Methylococcus capsulatus (Bath) fermentorban növesztett, illetve a rázatva nevelt baktérium kultúráit használtuk. Egész sejtekkel és a sejtekből preparált sejtmentes membrán és szolubilis frakciókban mértünk hidrogenáz aktivitást. Az aktivitást két klasszikus módszer segítségével határoztuk meg: A hidrogénfelvevő aktivitás mérés során keletkező redukált elektron akceptor spektrofotométerrel történő meghatározása és az enzimaktivitás kinetikájának spektrofotometriás úton való követése. A MMO aktivitásmérések és a hidrogénfejlesztő aktivitásmérések során gázkromatográfot használtunk a keletkező termékek analíziséhez. A molekuláris biológiai kísérletekhez a baktériumok esetében használatos DNS manipulációs technikákat használtuk (genomi és plazmid DNS izolálás, gének felszaporítása PCR reakcióval, klónozás, transzformálás, Southern hibridizáció).

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

- Membránkött hidrogenáz aktivitást detektáltam nitrogénfixáló és nitrogénáz gátolt növekedési körülmények között egyaránt.
- A létrehozott membránkött 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 - a folyamatban levő enzimtisztítás szempontjából fontos - alapvető biofizikai és biokémiai jellemzőit.
- Igazoltam, hogy az *in vivo* hidrogén-hajtott pMMO aktivitások esetén egyaránt 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.

Publikációk, előadások, poszterek

L.Bodrossy, 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.

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

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

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

K.L.Kovács, Cs.Bagyinka, L.Bodrossy, B.Fodor, K.Győrfi, **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.

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.

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

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

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

Hanczár T., 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 (in hungarian).

T.Hanczár, J.Klem, R.Csáki, L.Bodrossy, and 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, 7-12 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).

TÁRSSZERZŐI NYILATKOZAT

Alulírottak elismerjük, hogy Hanczár Tímeának alábbi közlemény eredményeiben meghatározó fontosságú szerepe volt, így a közlemény anyagát Ph.D. értekezésében felhasználhatja. Egyben nyilatkozunk, hogy tudományos fokozat megszerzéséhez az alábbi cikk anyagát nem használtuk fel, és a jövőben sem fogjuk felhasználni.

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

Csáki Róbert

Bodrossy Levente

Colin Murrell

Kovács L.Kornél

TÁRSSZERZŐI NYILATKOZAT

Alulírottak elismerjük, hogy Hanczár Tímeának alábbi közlemény eredményeiben meghatározó fontosságú szerepe volt, így a közlemény anyagát Ph.D. értekezésében felhasználhatja. Egyben nyilatkozunk, hogy tudományos fokozat megszerzéséhez az alábbi cikk anyagát nem használtuk fel, és a jövőben sem fogjuk felhasználni.

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

Csáki Róbert

Bodrossy Levente

Colin Murrell

Kovács L.Kornél