

**Szolubilis metán monooxygenáz
réz ion függő szabályozásának vizsgálata
Methylococcus capsulatus (Bath) törzsben**

Doktori értekezés

Készítette:

Csáki Róbert

Témavezetők:

Prof. Kovács L. Kornél
Dr. Bodrossy Levente

Szegedi Tudományegyetem Biotechnológiai Tanszék
MTA SzBK Biofizikai Intézet

Szeged
2005

BEVEZETÉS

A metán már az őslégkör egyik meghatározó eleme volt. Habár napjainkban csak kis mennyiségben fordul elő a légkörben, mégis jelentős hatással bír a földi életre. Nem elhanyagolható, mint üvegházhatást okozó gáz a globális felmelegedés szempontjából. Aerob és mikroaerofil környezetben a metanotrófok oxidálják a metánt. Ezek a baktériumok a metilotróf baktériumoknak egy olyan alcsoportja, melyek a legjelentősebb biológiai metán felhasználók a szárazföldi talajokban. A metanotrófok a metánt képesek egyedüli szén és energiaforrásként felhasználni. Mivel minden szárazföldi és vízi élőhelyen megtalálhatók, ezért meghatározóak globális metán körforgás szempontjából.

M. capsulatus (Bath) metanotróf törzsben a metán oxidációját kétféle enzim végzi, a sejt környezetében lévő réz(II) ionok mennyisége szerint. Magas réz(II) ion : sejt-biomassza arány esetén a réz ionokat tartalmazó, membrán kötött (partikuláris) Metán MonoOxigenáz (pMMO) fejeződik ki, míg alacsony réz(II) ion : sejt-biomassza arány esetén a réz ionok jelenlétében inaktiválódó, szolubilis metán monooxigenáz (sMMO). A sejtek környezetében megtalálható réz ionok mennyisége nemcsak az MMO-k bioszintézisét befolyásolja, hanem hatással van egy sor fiziológiás folyamatra pl.: belső membránrendszer bioszintézise, legalább két formaldehid dehidrogenáz szintézise és más réz transzporttal és szabályozással kapcsolatban álló polipeptidok bioszintézise. Már korai kísérletek megmutatták, hogy az sMMO jelentős biotechnológiai érdeklődésre tarthat számot, mivel több száz szerves vegyületet képes oxidálni, többek közt sok környezetszennyező anyagot. A *M. capsulatus* (Bath) felhasználhatóságát elősegíti, hogy extrém magas halogénezett szénhidrogén koncentráció mellett (pl. 50 mg Tri-klór-etilén/liter, ami az ivóvízben megengedett érték 10000-szerese) is megőrzi aktivitásukat

Az sMMO-t tartalmazó metanotrófokban fellelhető érdekes és nagyon szigorú réz függő regulációt már számos munka keretében próbálták felderíteni, de a szabályozás részletei és az ebben résztvevő gének, fehérjék mind a mai napig feltáratlanok maradtak. *M. capsulatus* (Bath) törzs esetében az smmo operon génjei egy az *mmoX* géntől 5' irányban elhelyezkedő promóter régióról íródnak át több különböző méretű mRNS-t létrehozva. Az *mmoX* promóter régiójában több σ^{70} és σ^N típusú promóterekre jellemző -10, -35, -12 és -24-es motívumot azonosítottak. Nielsen és mtsai végső konklúzióként σ^{70} típusú promóteret tételeztek fel.

CÉLKITŰZÉSEK

A szolubilis metán monooxigenáz enzimek egyedülálló katalitikus aktivitásuk révén számos környezetkímélő és gazdaságos biotechnológiai eljárás lehetséges katalizátorai. Gazdaságos és széleskörű felhasználásuknak gátat szab az enzim réz(II) ionokkal szembeni érzékenysége, valamint az enzim kifejeződésének gátlása réz ion jelenlétében. Az sMMO szabályozási mechanizmusának ismeretében lehetőség nyílik olyan törzsek kifejlesztésére, melyek *in situ* bioremediációs és biotranszformációs alkalmazásokban hatékonyan felhasználhatók. A *M. capsulatus* (Bath) anyagcseréjét nagymértékben meghatározó réz ion függő szabályozás megismerése nemcsak a biotechnológiai alkalmazhatóság miatt fontos, hanem a baktériumok nehézfémekkel szemben mutatott anyagcsere útvajairól kialakított képét is szélesíti.

Manapság 400-hoz közelít azon baktériumok száma, melyek genom szekvenciáját ismerjük. Belátható, hogy a nagyszámú konzervált, de ismeretlen funkciójú fehérje biológiai szerepe nem határozható meg pusztán a gének bázissorrendje alapján. Az ismert genom viszont kitűnő segítség a transzpozonos mutagenézissel nyert, ismert fenotípusú mutánsok mutációs helyének azonosításához. Így a transzpozonos mutagenézis az ismert genomszekvenciával hatékony eszközt képez például a réz függő szabályozásért felelős gének megtalálására, valamint az ismeretlen funkciójú, feltételezett gének szerepének megismerésére.

- Az *mmoX* promóter *in silico* vizsgálata
- Az *smmo* operon lehetséges promóter régióinak azonosítása
- Az *mmoX* promóter aktivitáshoz nélkülözhetetlen régiók azonosítása promóter próba vektorral
- Az *smmo* operon környező génjeinek klónozása, bázissorrend meghatározása, *in silico* analízise
- Az azonosított gének mutagenézise, a mutánsok fenotípusos vizsgálata, tekintettel az sMMO kifejeződésének megváltozására
- Konjugációs génbeviteli rendszer optimalizálása *M. capsulatus* (Bath) törzsre
- Transzpozonos mutagenézis kidolgozása *M. capsulatus* (Bath) törzsre
- sMMO kifejeződését befolyásoló mutánsok előállítás és azonosítása transzpozonos mutagenézissel

MÓDSZEREK

A kísérletekhez a *M. capsulatus* (Bath) és *E. coli* törzsek rázatott folyadék, illetve táplemezen növesztett kultúráit használtam. Molekuláris biológiai kísérletekhez a baktériumok esetén használatos DNS és RNS manipulációs módszereket alkalmaztam (genomi DNS és plazmid tisztítás, RNS tisztítás, DNS darabok felszaporítása PCR technikával, klónozás, transzformálás, Southern hibridizáció, RT-PCR). Idegen DNS *M. capsulatus* (Bath) sejtekbe történő bejuttatásához konjugációs módszert használtam. Irányított és transzpozonos mutagenézis módszerével készítettem mutánsokat. *M. capsulatus* (Bath) vad típusú és mutáns törzsek sMMO aktivitását tápoldatban rázatva növesztett kultúrákon vizsgáltam spektrofotometriás méréssel. A transzpozonos mutánsok kiszűréséhez táplemezen határoztam meg a kolóniák sMMO aktivitását. Az sMMO fehérje alegységeinek kimutatására Western hibridizációs technikát alkalmaztam. A zöld fluorescens proteint (GFP), mint riportert fehérjét használtam promóter próba vektroban a vizsgálni kívánt DNS szakaszok promóter aktivitásának meghatározásához. Internetes, illetve helyi bioinformatikai eszközöket alkalmaztam a DNS és fehérje szekvencia adatok vizsgálatához.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

- I. Bioinformatikai eszközök segítségével a σ^N promóterekre jellemző σ^N kötő és IHF (Integration Host Factor) kötő DNS motívumokat azonosítottam az *mmoX* 5' régiójában.
- II. Megmutattam, hogy az *mmoX* ATG kodonjától -358 és -280 bázispárok közé eső, az IHF kötő helytől 5' irányban elhelyezkedő, régió elengedhetetlenül szükséges az *mmoX* promóter részfüggő működéséhez.
- III. Meghatároztam az *mmoC*-től 3' irányban elhelyezkedő 9,5 kb ismeretlen szekvenciájú DNS szakasz bázissorrendjét. Azonosítottam *mmoG*, *mmoQ*, *mmoS* és *mmoR* géneket az *mmoC*-től 3' irányban elhelyezkedő 9,5 kb hosszúságú DNS szakaszon.

- IV. Megmutattam, hogy az *mmoXYZZCG* sMMO struktúrgéneket tartalmazó operonban található *mmoXY* és *mmoCG* intergenikus régióknak nincs promóter aktivitása. Az eredmények alapján feltételeztem, hogy *mmoXYZZCG* gének az *mmoX* 5' régiójában elhelyezkedő σ^N promóterről íródnak át.
- V. σ^{70} típusú promóter motívumokat azonosítottam *mmoS* és *mmoR* gének 5' régióiban.
- VI. Bioinformatikai eszközök segítségével meghatároztam *mmoG*, *mmoQ*, *mmoS* és *mmoR* gének fehérjetermékeinek feltételezett funkcióját ismert fehérjékhez való hasonlóságuk alapján: MmoG egy GroEL-hez hasonló chaperonin, MmoS a két-komponensű szenzor-regulátor rendszerek szenzor fehérjéjével, MmoQ a regulátor fehérjéjével mutatnak nagyfokú rokonságot. MmoR felépítése megegyezik a σ^N -függő transzkripciós aktivátorok felépítésével.
- VII. Előállítottam az *mmoG*, *mmoQ*, *mmoS* és *mmoR* génekre nézve mutáns *M. capsulatus* (Bath) törzseket. A mutáns törzsek növekedési sebességének, sMMO aktivitásának, *mmoX* transzkripciójának és sMMO alegységek termelődésének vizsgálatával megmutattam, hogy *mmoG* és *mmoR* elengedhetetlen az sMMO enzim termelődéséhez „réz mentes” körülmények közt.
- VIII. Megmutattam, hogy $\Delta mmoS$ és $\Delta mmoQ$ mutánsokban az *mmoX* 5' régiójában lévő promóter konstitutívan működik. 2 μ M réz-szulfátot tartalmazó táplemezen még sMMO aktivitás is mérhető *mmoS* és *mmoQ* mutánsokban, míg a vad típusban nincs sMMO aktivitás ilyen réz ion koncentráció mellett.
- IX. 5 μ M réz-szulfátot tartalmazó médiumban nem mérhető sMMO aktivitás *mmoS* és *mmoQ* mutánsokban. Megmutattam, hogy ilyen körülmények között az sMMO alegységei nem mutathatók ki, de mRNS képződik *mmoX* promóterről. Feltételeztem, hogy ilyen körülmények közt a réz ionok által inaktivált sMMO molekulák gyorsan degradálódnak.

- X. Kidolgoztam egy megfelelő hatékonysággal működő transzpozonos mutagenézis módszert *M. capsulatus* (Bath) törzsre. A módszer lehetővé teszi nagyszámú transzpozonos mutáns előállítását pozitív szelekcióval. A mutánsokban a transzpozon csak egy példányban, véletlenszerűen épül be *M. capsulatus* (Bath) genomjába. Az általam kidolgozott módszerrel a transzpozont határoló genomi DNS bázissorrend könnyen, gyorsan azonosítható. Ez az első megfelelő hatékonysággal működő transzpozonos mutagenézis módszer *M. capsulatus* (Bath) törzsre, amely alkalmas a *M. capsulatus* (Bath) fiziológiai folyamatainak, ismeretlen szerepű génjeinek megismerésére.
- XI. Készítettem egy *M. capsulatus* (Bath) transzpozonos mutáns könyvtárat, amelyből izoláltam 77 db sMMO aktivitásában sérült mutáns törzset. 5 mutánsban meghatároztam a transzpozon beépülésének helyét és az azt határoló genomiális DNS szakasz bázissorrendjét. A *M. capsulatus* (Bath) genom-szekvenciájában azonosítottam a mutáns géneket. A mutációt szenvedett gének és operonok sokszínűsége alapján feltételeztem, hogy az sMMO réz-függő szabályozása igen összetett folyamat *M. capsulatus* (Bath) törzsben.

PUBLIKÁCIÓK

R. Csáki, L. Bodrossy, J. Klem, J. C. Murrell & K. L. Kovacs. Genes involved in the copper-dependent regulation of soluble methane monoxygenase of *Methylococcus capsulatus* (Bath): cloning, sequencing and mutational analysis *Microbiology* (2003) 149: 1785-1795

R. Csáki. Investigation of the copper-regulated expression of methane monoxygenases in *Methylococcus capsulatus* (Bath). *Acta Biologica Szegediensis* (2002) 46 (1-2):31

Fodor BD, Kovacs AT, **Csáki R**, Hunyadi Gulyas E, Klement E, Maroti G, Meszaros LS, Medzihradsky KF, Rakhely G, Kovacs KL. Modular broad-host-range expression vectors for single protein and protein complex purification. *APPL ENVIRON MICROB* 70: (2) 712-721 (2004)

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

Csáki R., Hanczár T., Klem J., Panmerr A. és Kovács L. K. A metán anyagcsere réz-függő szabályozása metanotrófokban. Lecture presented at Straub Days, MTA SzBK, Szeged, Hungary, 25-30 Nov 2001.

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.

K. L. Kovács, Cs. Bagyinka, L. Bodrossy, **R. Csáki**, B. Fodor, K. Györfi, T. Hanczár, M. Kálmán, J. Ósz, K. Perei, B. Polyák, G. Rákhely, M. Takács, A. Tóth, J. Tusz, Recent advances in biohydrogen research. *Pflügers Arch – Eur. J. Physiol.* (2000) 439:81-83.

Kovács K.I, Bagi Z., Bagyinka Cs., Bodrossy L., **Csáki R.**, Fodor B., Hanczár T., Jennifer T., Kálmán M., Klem J., Kovács Á., Jian L., Magony M., Maróti G., Perei K., Polyák B., Solmaz A., Takács M., Tóth A., Rákhely G.. Biohidrogén, Biogáz, Bioremediáció. *Acta Biol. Debrecina* (2000) Vol. 22

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.

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).