

**Szolubilis metán monooxygenáz
rézfüggő 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

Tartalomjegyzék

<u>Rövidítések jegyzéke</u>	4
<u>Irodalmi áttekintés</u>	5
<u>1.1. A metán</u>	5
<u>1.2. A biológiai metán oxidáció</u>	7
<u>1.3. A metanotrófok filogenetikai csoportosítása</u>	7
<u>1.4. Modell organizmus: <i>Methylococcus capsulatus</i> (Bath)</u>	8
<u>1.5. A <i>M. capsulatus</i> (Bath) biotechnológiai felhasználása</u>	9
<u>1.6. A <i>M. capsulatus</i> (Bath) fiziológiája</u>	10
<u>1.7. A <i>M. capsulatus</i> (Bath) metán-monooxigenázai</u>	11
<u>1.7.1. A membránkött metán-monooxigenáz</u>	11
<u>1.7.2. A szolubilis metán-monooxigenáz</u>	12
<u>1.8. A réz-ion anyagcsere</u>	16
<u>1.9. A <i>pmo</i> és <i>smmo</i> gének és transzkripció szabályozásuk</u>	17
<u>1.10. Két-komponensű szenzor-regulátor rendszerek</u>	20
<u>1.11. A <i>M. capsulatus</i> (Bath) genom</u>	22
<u>1.12. A metanotrófok molekuláris biológiája</u>	22
<u>1.12.1. Mutagenézis</u>	22
<u>1.12.2. Mini-transzpozonok</u>	23
<u>1.12.3. DNS beviteli rendszerek</u>	23
<u>Célkitűzések</u>	25
<u>2.1. Általános célkitűzések</u>	25
<u>2.2. Részletes célkitűzések</u>	25
<u>Anyagok és módszerek</u>	26
<u>3.1. Tápoldatok és felhasznált baktérium törzsek</u>	26
<u>3.2. A konjugáció</u>	26
<u>3.3. sMMO aktivitásmérés</u>	27
<u>3.3.1. sMMO aktivitásfestés folyadék kultúrában</u>	27
<u>3.3.2. sMMO aktivitásfestés lemezen</u>	27
<u>3.4. GFP fluoreszcencia mérése</u>	27
<u>3.5. SDS-PAGE és Western hibridizáció</u>	28
<u>3.6. Standard DNS technikák</u>	28
<u>3.6.3. Kromoszómális DNS izolálása <i>M. capsulatus</i> (Bath) törzsekből</u>	28
<u>3.6.4. Southern hibridizáció</u>	29
<u>3.6.4.1. Digoxigeninnel jelölt próba készítése</u>	29
<u>3.6.4.2. Southern blot, hibridizálás és detektálás</u>	29

3.6.5. Plazmid tisztítás <i>Escherichia coli</i> -ből	29
3.6.6. DNS emésztése restriktációs enzimekkel	30
3.6.7. Agaróz gélelektroforézis	30
3.6.8. DNS izolálása gélből	30
3.6.9. Polimeráz láncreakció (PCR)	30
3.6.10. Ligálás	31
3.7. Kompetens sejt készítés kémiai módszerrel	31
3.8. Transzformálás	31
3.9. RNS tisztítás	31
3.10. <i>mmoX</i> RT-PCR	32
3.11. A DNS szekvenciák in silico analízise	32
3.12. Az <i>mmoC</i> 3' régió klónozása és bázissorrend meghatározása	32
3.13. A plazmidok készítése	36
3.14. Transzpozonos mutagenézis	42
3.14.1. Mini-transzpozon integrációs helyének azonosítása	42
Eredmények és tárgyalásuk	46
4.1. <i>mmoX</i> promóter régiójának elemzése	46
4.2. Az sMMO struktúrgénektől 3' irányban elhelyezkedő DNS régió vizsgálata	49
4.3. Az új nyitott leolvasási keretek szekvencia analízise	50
4.3.1. MMOG, a feltételezett chaperonin	50
4.3.2. Az MMOS-MMOQ, a feltételezett két-komponensű jelátvivő rendszer	51
4.3.3. Az MMOR, σ^N -függő transzkripció aktivátor	53
4.3.4. Az <i>mmoR</i> és <i>mmoG</i> gének összehasonlítása <i>M. capsulatus</i> (Bath) és <i>M. trichosporium</i> Ob3B törzsekben	54
4.4. <i>mmoXY</i> és <i>mmoCG</i> intergenikus régiók promóter aktivitása	56
4.5. $\Delta mmoG$, $\Delta mmoR$, $\Delta mmoS$ és $\Delta mmoQ$ mutánsok jellemzése	57
4.6. A munkamodell	63
4.7. A konjugáció optimalizálása transzpozonos mutagenézishez	66
4.8. sMMO mutánsok előállítása transzpozonos mutagenézissel	68
A dolgozatban leírt új tudományos eredmények	71
Hivatkozások jegyzéke	73
A dolgozat témájához kapcsolódó saját közlemények jegyzéke	79
Köszönetnyilvánítás	81
Summary	82

Rövidítések jegyzéke

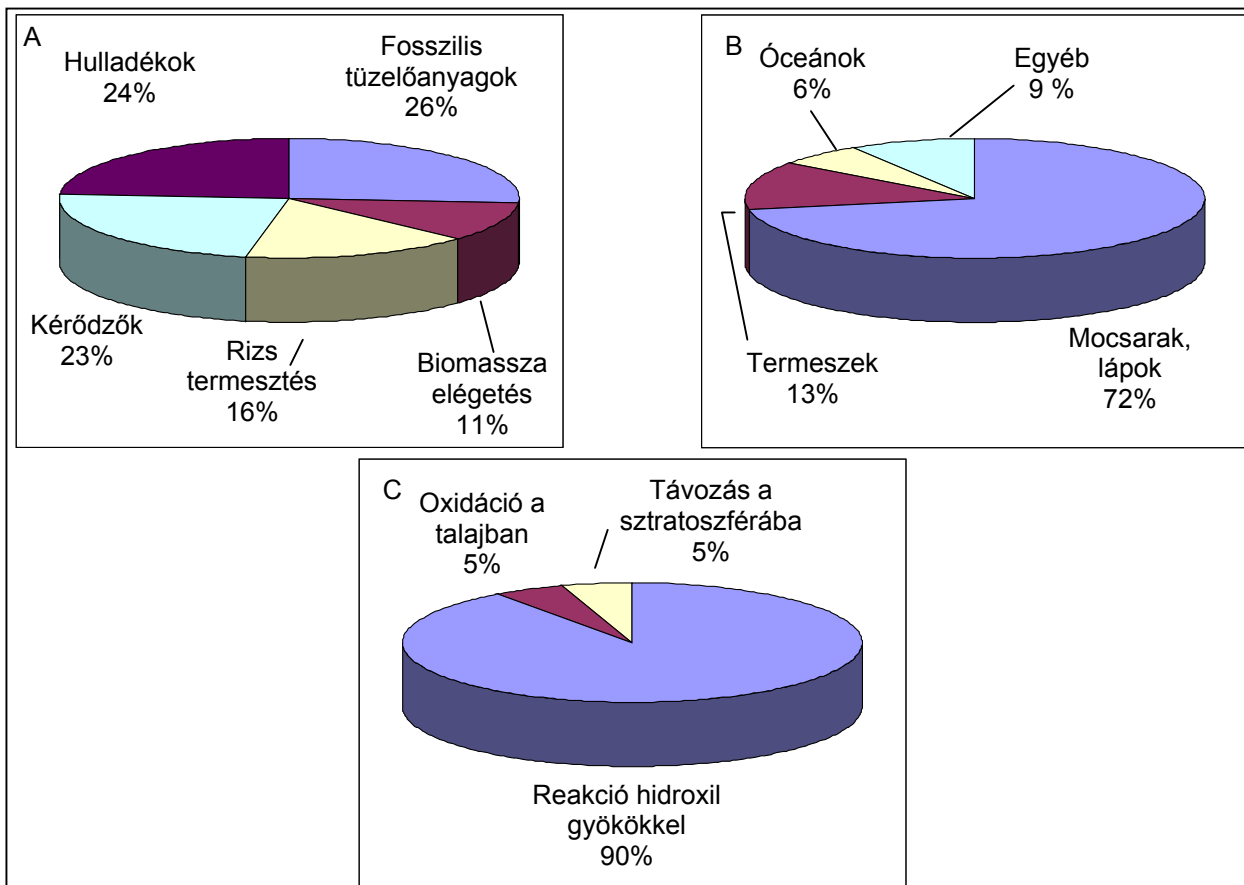
AMO	ammónia monooxygenáz
cICAT	cleavable Isotope-Coded Affinity Tag
CFU	kolónia képző szám (Colony Forming Unit)
CIRCE	Controlling Inverted Repeat of Chaperon Expression
CSPD	dinátrium 3-(4-metoxispiro(1,2-dioxetán-3,2'-(5'-klór)triciklo[3,3.1.1 ^{3.7}]decan}-4-yl) fenil foszfát
CTAB	N-acetil-N,N,N-trimetil-ammónium bromid
DCE	diklór-etilén
DCM	diklórmétán
DIG	digoxigenin
DMSO	dimetilszulfoxid
EDTA	etiléndiamin-tetraecetsav dinátrium sója
EtBr	etidium-bromid
FAD	flavin-adenin-dinukleotid
FADH	formaldehid dehidrogenáz
FDH	formát dehidrogenáz
GFP	zöld fluorescens fehérje (Green Fluorescent Protein)
Gm	gentamicin
H ₄ MPT	tetrahidro-metanopterin
IHF	Integration Host Factor
IR	fordítottan ismétlődő szekvenciák (Inverted Repeat)
kDa	kiloDalton
LB	Luria-Bertani tápoldat
MCS	multiple cloning site
MDH	metanol dehidrogenáz
MMO	metán monooxygenáz
M-MLV	moloney murine leukemia virus
NAD	nikotinamid-adenin-dinukleotid
NADH+H ⁺	redukált nikotinamid-adenin-dinukleotid
NMS	nitrát minimál só
ORF	nyitott leolvasási keret (Open Reading Frame)
PCR	polimeráz láncreakció (Polymerase Chain Reaction)
pMMO	partikuláris metán monooxygenáz
rpm	percenkénti fordulatszám (revolutions per minute)
RBS	riboszóma kötő hely (Ribosomal Binding Site)
RTF-régió	rezisztencia-transzfer-funkciós régió
RuMP	ribulóz monofoszfát
SDS	nátrium-dodecil-szulfát
SET	20% szacharóz, 50 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl
sMMO	szolubilis metán monooxygenáz
SOB	NaCl, Bacto tripton, élesztőkivonat
TAE	Tris- acetát, EDTA
TCE	triklór-etilén
TE	Tris-HCl, EDTA
THF	tetrahidro-folát
TIGR	The Institute for Genomic Research
TOD	tetrazotizált-orto-dianizidin
TRIS	Tris-(hidroximetil)-metilamin
UAS	Upstream Activator Sequence

Irodalmi áttekintés

1.1. A metán

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. A szerves gázok közül a metán fordul elő legnagyobb mennyiségben a légkörben. A metán sokkal nagyobb mértékben képes az infravörös sugarak elnyelésére, ezért azonos anyagmennyiséget tekintve, a metán sokkal „hatékonyabb” üvegházhatást okozó gáz, mint a CO₂. (Houghton és *mtsai.*, 2001)

Az utolsó eljegesedés óta a légköri metán mennyisége folyamatosan növekszik: 1750-től 1998-ig a metán mennyisége 150%-kal növekedett, amint azt az USA Környezetvédelmi Hivatalának honlapján olvashatjuk: www.epa.gov. Ma a légköri metánkibocsátás 65%-a az ember tevékenységéhez kapcsolódik (1. ábra A) és ennek mértéke évről évre fokozódik. A légkörbe kibocsátott metán közel 90%-át a hidroxilgyökök fotokémiai úton eloxidálják és közben CO₂ és CO keletkezik. Ha a légköri metánkibocsátás továbbra is ilyen ütemben nő, akkor a következő évszázadban az üvegházhatás 25%-áért már a metán lesz a felelős, becslések szerint a légköri metán mennyisége évente 25 Tg-mal növekszik (1. ábra) (Houghton és *mtsai.*, 2001). Egyéb üvegházhatású gázokkal (főleg CO₂) együtt ez a növekedés 2-6 °C-os felmelegedést mutat egy évszázadra előre vetítve globális átlagban. Ezért lenne egyre sürgetőbb feladat ezen gázok kibocsátásának szabályozása. Számítások szerint a metán kibocsátás 10%-os csökkentése már stabilizálná a gáz jelenlegi atmoszférikus koncentrációját (Houghton és *mtsai.*, 2001). Ahhoz, hogy ez elérhető legyen a metánt nagy tömegben kell oxidálni és/vagy beépíteni szerves vegyületekbe.



1. ábra. A légkör metán tartalmának változása.

(A); Az emberi tevékenységből származó metán megoszlása (összesen 375 Tg metán / év).

(B); A természetes forrásokból származó metán megoszlása (összesen 200 Tg metán / év).

(C); A metán mennyiségét csökkentő tényezők megoszlása (összesen 550 Tg metán / év).

1.2. A biológiai metán oxidáció

A biológiai metán oxidáció történhet aerob módon a szárazföldi és vízi élőhelyeken, valamint anaerob módon az üledékekben és oxigén mentes, sós vizekben. Anaerob körülmények közt pl.: mélytengeri környezetben egy, a fotoszintézistől független tápláléklánc is létezik a metanotrófokra és kemolitotróf organizmusokra alapozva (Valentine és Reeburgh, 2000). Az 1980-as évektől kezdve napvilágot láttak olyan adatok, melyek leírják a tengeri üledékekben a metán mennyiség csökkenését. A metán mennyiségének változása szoros összefüggést mutatott a helyben megtalálható szulfát mennyiségével. Az 1990-es években már izotópos és molekuláris biológiai módszerekkel bizonyították, hogy a mélytengeri üledékekben szulfát-redukáló baktériumok és metanogén archeák alkotta konzorcium képes anaerob metán oxidációra (Hansen és mtsai., 1998). Mivel a folyamatban a metanogén archeák vesznek részt, a folyamatot „reverz metanogenezisnek” nevezték el (Hallam és mtsai., 2004). Manapság már sikerült dúsított kultúrákat is előállítani, melyek biokémiai jellemzése folyamatban van (Chistoserdova és mtsai., 2005). Az anaerob metán oxidáció folyamatát a metanogenezis megfordítottjaként feltételezik, ahol a metanogének által kibocsátott eddig azonosítatlan anyagcsereterméket a szulfát-redukálók hasznosítják elektron donorként.

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. Ezeken az élőhelyeken nemcsak a helyben, biológiai úton, a metanogén archeák által termelt metán felhasználása folyik, hanem a légkörből megkötött metáné is.

1.3. A metanotrófok filogenetikai csoportosítása

A baktériumok közt a metanotrófok csak kevés csoportban találhatók meg. Mind a mai napig csak a proteobaktériumok 11 nemzetségében találhatók képviselőik. A ma ismert metanotrófok két fő típusba sorolhatók, főként filogenetikai helyzetük, fiziológiai különbségeik és a belső membránstruktúrájuk alapján (1. táblázat).

1. táblázat. A metanotrófok csoportosítása.

Tulajdonság	I. típus	II. típus
DNS G+C tartalma (mol %)	43-66	62-63
membrán elrendezése	korong alakú intracitoplazmatikus membránkötegek	párhuzamos lefutású intracitoplazmatikus membránkötegek
formaldehid-asszimilációs útvonal	RuMP* / szerin	szerin
proteobaktériumok szubdivízió-típusa	gamma	alfa
legfőbb foszfolipid zsírsav	16 : 1	18 : 1
Nemzetségeik	<i>Methylomonas</i> , <i>Methylobacter</i> , <i>Methyломicrobium</i> , <i>Methylococcus</i> , <i>Methylocaldum</i> , <i>Methylosarcina</i> , <i>Methylosphaera</i>	<i>Methylosinus</i> , <i>Methylocapsa</i> , <i>Methylocella</i> , <i>Methylocystis</i>

* RuMP = ribulóz-monofoszfát.

1.4. Modell organizmus: *Methylococcus capsulatus* (Bath)

Manapság a *M. capsulatus* (Bath) a leginkább tanulmányozott metanotróf. Ez a *Methylococcus* nemzetségbe tartozó baktérium nem teljesen illik az I-es típusú metanotrófok közé, mivel metán anyagcsere útvonalában a formaldehid asszimiláció szerin útvonala is megtalálható. Ezen kívül G+C tartalma is magasabb az



2. ábra. *M. capsulatus* (Bath), transzmissziós elektronmikroszkópos képe. (forrás: www.uib.no/elin/elpub/uibmag/en02/bacteria.html)

első típusba sorolt metanotrófokhoz képest, ezért régebben külön típusba (X típus) sorolták, de a 16S rRNS bázissorrenden alapuló filogenetikai tanulmányok alapján ma az I-es típusba sorolják. A *M. capsulatus* (Bath), mint a neve is mutatja, kokkoid baktérium. Folyadék kultúrában jellegzetesen a diplokokkusz forma dominál. Az elektron-mikroszkópos képen legfeltűnőbb jellemzője, a párhuzamos „zsákokba” rendeződött intracito-plazmatikus membránok (2. ábra). A *M. capsulatus* (Bath) 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 pMMO fejeződik ki, míg alacsony réz(II)-ion : sejt-biomassza arány esetén a réz-ionok jelenlétében inaktiválódó, sMMO (Berson és Lidstrom, 1997). Már korai kísérletek megmutatták, hogy az sMMO jelentős biotechnológiai érdeklődésre

tarthat számot, mivel több száz szerves vegyületet képes oxidálni, többek közt sok környezetszennyező anyagot.

1.5. *A M. capsulatus (Bath) biotechnológiai felhasználása*

A halogénezett szénhidrogének *in situ* mikrobiológiai lebontására irányuló kísérletekben figyelték meg, hogy a halogénezett vegyületek biológiai lebontása jelentősen felgyorsult, amikor a talajba földgázt juttattak be (Colby és *mtsai.*, 1977). Ez volt az első fontos észlelés, amely a földgáznak (=metánnak) a TCE-t lebontó biológiai folyamatokra gyakorolt pozitív hatására utalt. A részletes vizsgálatok egyértelműen bizonyították egyrészt a metanotróf baktériumoknak a lebontásban játszott szerepét, másrészt azt, hogy a lebontás epoxidokon keresztül teljesen végbemegy, széndioxid és biomassza keletkezik. A *M. capsulatus* (Bath) felhasználhatóságát növeli, hogy extrém magas halogénezett szénhidrogén koncentráció mellett (pl.: 50 mg TCE l⁻¹, ami az ivóvízben megengedett érték 10000-szerese) is megőrzi aktivitásukat (Fliermans és *mtsai.*, 1988). A *M. capsulatus* (Bath)-ban jelenlévő metán monooxygenáz enzimek nemcsak bioremediációs szempontból fontosak, hanem különböző biokonverziós eljárásokban is sikerrel alkalmazzák őket (2. táblázat): pl.: etilénből etilén-glikol és epoxidok gyártása során (Richards és *mtsai.*, 1994). Az eddig alkalmazott szubsztrátok száma több mint 250-re rúg.

2. táblázat. A *M. capsulatus* (Bath) által oxidált, környezetvédelmileg fontos anyagok.

Vegyület	Tiszta tenyészet által produkált termék
klórmétán	formaldehid
di-klórmétán	szénmonoxid
tri-klórmétán (kloroform)	széndioxid
brómmétán	formaldehid
benzol	fenol és hidrokinon
Toluol	<i>p</i> -krezol, benzil-alkohol, benzoésav
stirén	sztirénoxid és hidrosztirén
m-krezol	hidroxibenzaldehid
o-krezol	5-metil-1,3-benzoldiol
m-klorotoluol	benzil-alkoholok
Naftalin	naftolok
1- and 2- metilnaftalin	NK
vinilklorid	NK
1,2 & 1,1-diklóretilén	NK
triklóretilén	diklórecetsav és TCE-diol (széndioxid)
1,1- & 1,2-diklóretán	NK
1,1,1- & 1,1,2-triklóretán	NK

NK= Nem Kimutatható

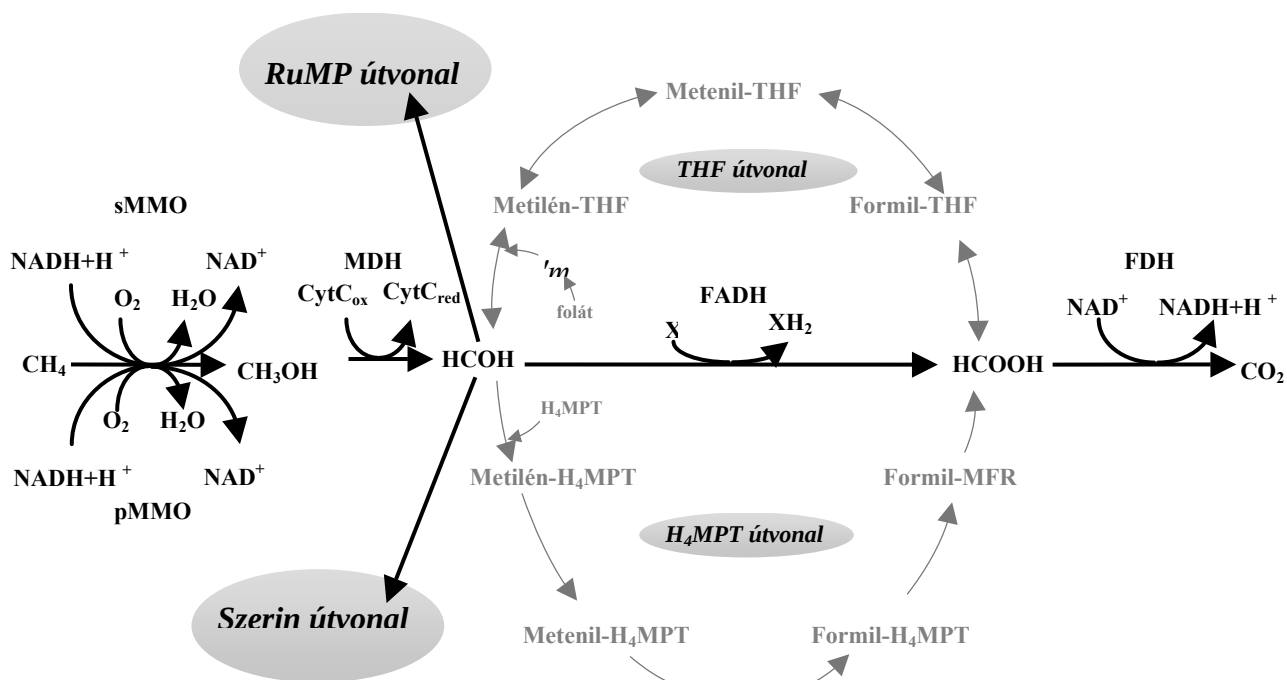
A metanotrófok kemolitotróf baktériumok lévén egyszerű só oldatban képesek növekedni, metán és oxigén jelenlétében (Hanson és Hanson, 1996, Kelly és mtsai., 2005). A *M. capsulatus* (Bath) optimális növekedési hőmérséklete 45°C, ami nem kedvez a patogén mikroorganizmusoknak, ezért a kőolaj lelőhelyeken olcsón rendelkezésre álló földgázzal már régóta termelik egysejt fehérjeként állati takarmány-kiegészítőnek (NorFerm AG., Norvégia, Dánia) (3. ábra).



3. ábra. A *M. capsulatus* (Bath) egysejt fehérje termelő üzem és az előállított termék (www.norferm.no).

1.6. A *M. capsulatus* (Bath) fiziológiája

A metán monooxygenáz enzimek az első lépésben a metánt metanollá oxidálják $\text{NADH} + \text{H}^+$ és molekuláris oxigén felhasználásával. A képződött metanolt a metanol dehidrogenáz (MDH) alakítja formaldehiddé citokróm-c közreműködésével. A formaldehidet a sejt beépítheti saját szerves anyagaiba a RuMP, vagy a szerin útvonalon. Ha a formaldehid nem épül be a sejt anyagaiba, akkor a formaldehid dehidrogenáz (FADH) és a formát dehidrogenáz (FDH) segítségével széndioxiddá oxidálódik (4. ábra) (Hanson és Hanson, 1996). A *M. capsulatus* (Bath) genomszekvenciájának ismeretében újabb formaldehid oxidációs útvonalakat feltételeznek, melyekben a metanogénekben megtalálható tetrahydrofolát (THF) és tetrahydro-metanopterin (H_4MPT) tartalmú enzimek játszanak szerepet (Ward és mtsai., 2004).



4. ábra. A *M. capsulatus* (Bath) metán oxidációs út vonalai.

1.7. A *M. capsulatus* (Bath) metán-monooxygenázai

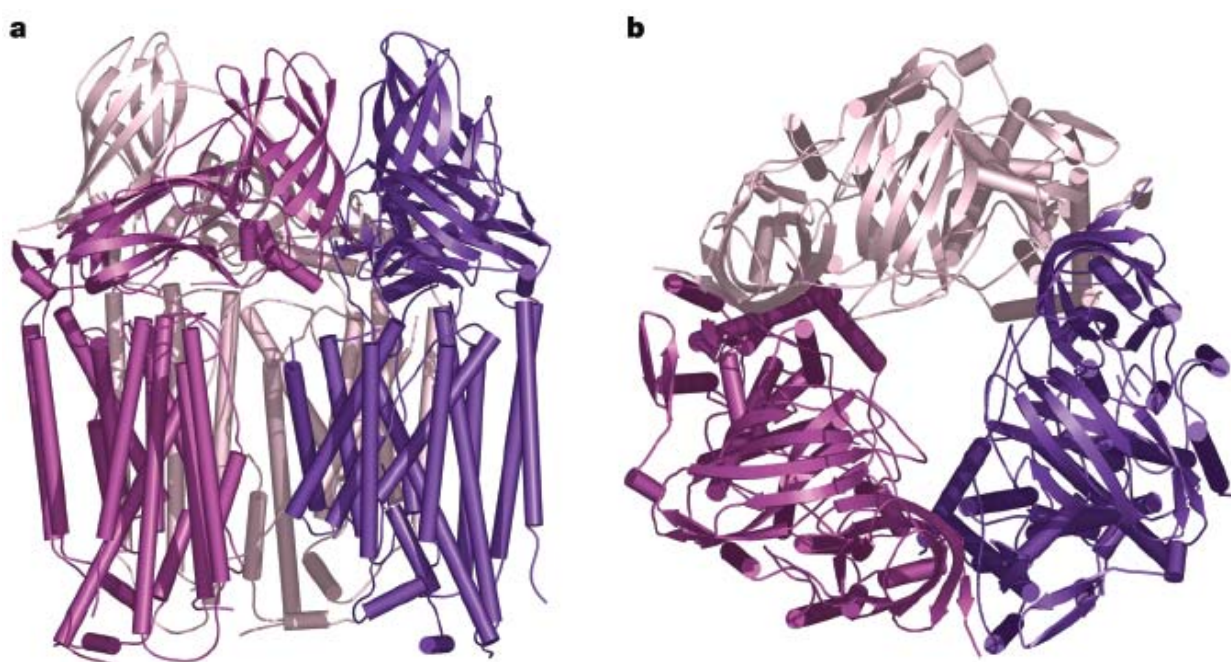
Metanotrófokban a leginkább tanulmányozott enzimek a metán-monooxygenázok. Mivel ezek ártalmatlanítják a környezetszennyező vegyületeket, főleg ezeket használják a biokonverziós folyamatokban. A *M. capsulatus* (Bath) törzsben található kétféle MMO tulajdonságai nagymértékben különböznek. Minden ismert metanotrófban megtalálható a membrán kötött pMMO, míg a citoplazmában elhelyezkedő sMMO csak néhány metanotróf fajban található meg (Dedysh és *mtsai.*, 2001). A két enzim csak funkciójában egyezik meg, semmiféle felépítésbeli vagy molekuláris szintű rokonság nincs köztük. Biotechnológiai szempontból igen lényeges, hogy az sMMO képes oxidálni több száz szénhidrogént (Colby és *mtsai.*, 1977), a pMMO pedig csak néhány alkánt képes oxidálni. Ezért a kutatások nagy része az sMMO mind szélesebb körű és hatékony biotechnológiai felhasználhatóságát célozza a bioremediáció és biokonverzió területén. Az sMMO és a pMMO kifejeződését a sejtek környezetében lévő réz-ionok mennyisége határozza meg (ld. A 1.4. fejezet).

1.7.1. A membránkötött metán-monooxygenáz

A pMMO sokkal kevésbé ismert, mint az sMMO, mivel igen nehéz az enzimet aktív formában tisztítani, valamint vizsgálni *in vitro*. A metanotrófokban található pMMO nagy hasonlóságot mutat a nitrifikáló baktériumokban fellelhető ammónia monooxygenázzal (AMO). Mindkét enzim hasonló polipeptidekből épül fel, rezet igényelnek működésükhöz, illetve képesek egymás elsődleges szubsztrátjait hasznosítani, ha nem is azonos aktivitással, mint a saját

elsődleges szubsztrátjukat. A pMMO és az AMO gének csak a metanotrófokra és a nitrifikáló organizmusokra jellemzőek, homológ géneket eddig nem találtak más élőlényekben.

2005 márciusában Rosenzweig és munkatársa (Lieberman és Rosenzweig, 2005) áttörést értek el a pMMO szerkezetkutatásában. 2,8 Å felbontással meghatározták a *M. capsulatus* (Bath) pMMO kristályszerkezetét. A pMMO egy 105 Å hosszú és 90 Å átmérőjű hengeres formát alkot, $\alpha_3\beta_3\gamma_3$ (PMOA= α , PMOB= β , PMOC= γ) elrendezésben, egy csatornával a közepén (5. ábra). Meghatározták, hogy egy pMMO molekula kilenc réz-iont és három, még azonosításra váró fém iont tartalmaz (Lieberman és Rosenzweig, 2005).



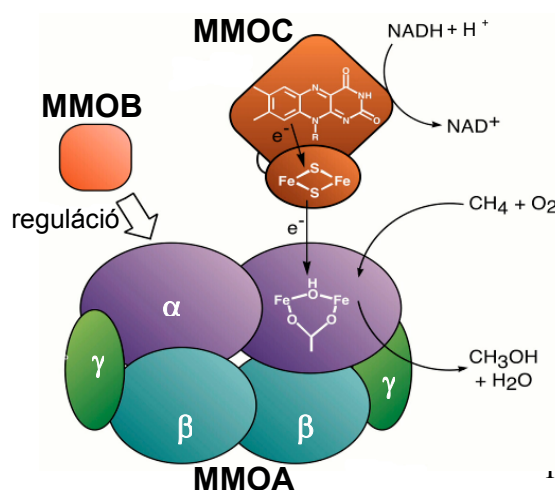
5. ábra. A *M. capsulatus* (Bath) pMMO kristályszerkezete (a) a sejtmembránnal párhuzamos és (b) arra merőleges nézetben. A három protomer sötétkék, lila és halvány rózsaszínnel van jelölve. Egy protomer $\alpha\beta\gamma$ alegységekből áll.

1.7.2. A szolubilis metán-monooxygenáz

Az sMMO lényegesen nagyobb *in vitro* stabilitása miatt a kezdetekben a figyelem erre az enzimre irányult.

Az sMMO által katalizált reakció: $\text{CH}_4 + \text{O}_2 + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_3\text{OH} + \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O}$.

Az sMMO-t a következő metanotrófokban tanulmányozták eddig: *M. capsulatus* (Bath) (Stanley és mtsai., 1983), *Methylosinus trichosporium* OB3b (Lipscomb, 1994), *Methylobacterium* CRL-26 (Shigematsu és

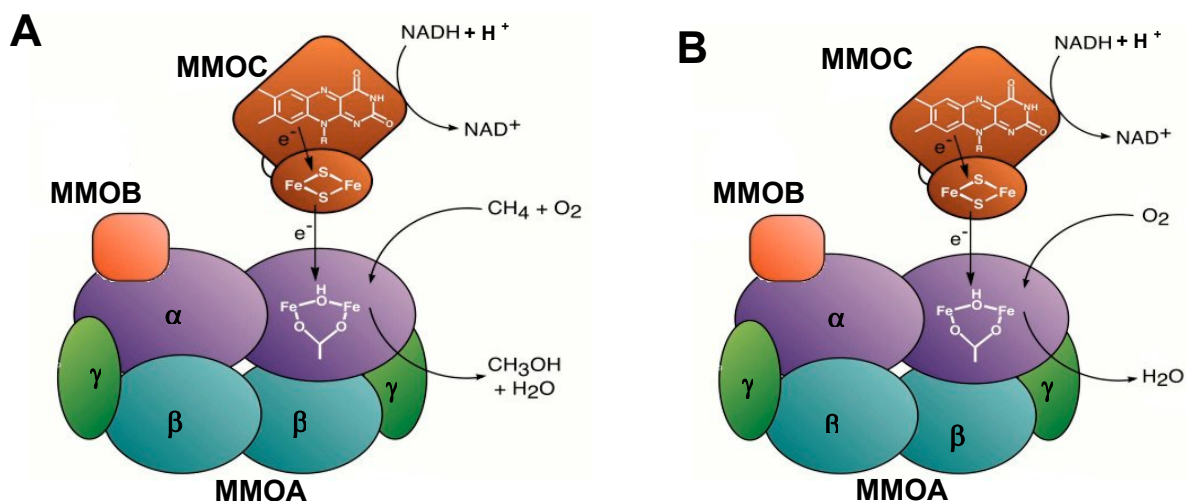


6. ábra. Az sMMO sematikus rajza.

mtsai., 1999), *Methylosinus sporium* 5, a *Methylocystis* M törzs és a *Methylocystis* WI 14 (Lipscomb, 1994). Az sMMO enzimek nagy hasonlóságot mutatnak más baktériumokban megtalálható alkán-monooxygenázokkal, fenol-hidroxilázokkal és a 4 komponensű aromás monooxygenázokkal (Leahy és mtsai., 2003). Az sMMO három protein komponensből áll: a hidroxiláz [MMOA], a szabályzó [MMOB] és a NADH-függő reduktáz [MMOC] (Lipscomb, 1994) komponensekből (6. ábra). A komponensek közül a B és C egyetlen alegységből felépülő fehérjék, míg az A komponens három alegységből áll össze (Rosenzweig és mtsai., 1992).

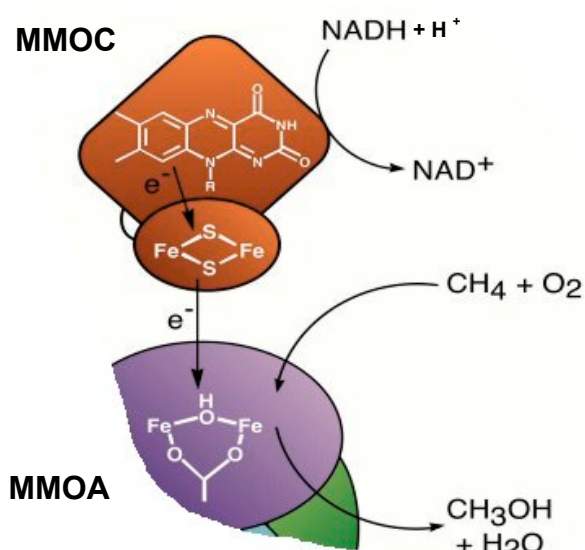
A **hidroxiláz komponens** (MMOA) három különböző alegysége, az α -, a β - és a γ , amelyek $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ elrendezésben építik fel azt (6. ábra). A hidroxiláz komponens egy 251 kDa molekulatömegű, vastartalmú, nem hem típusú prosztetikus csoportot tartalmazó metalloprotein, amelynek mindkét α -alegysége tartalmaz kettő, vas-iont hordozó aktív centrumot (Rosenzweig és mtsai., 1995). Ez a komponens felelős a kétatomos oxigén molekula aktiviálásáért és a metán közvetlen oxidálásáért.

A **szabályzó komponens** (MMOB) egy 16 kDa molekulatömegű, prosztetikus csoport nélküli polipeptid. Jelenléte elengedhetetlen a *M. capsulatus* (Bath) hidroxilázának működéséhez. Szénhidrogén szubsztrát hiányában *in vitro* elektronok transzportálódnak a NADH-ról a reduktáz komponensre, onnan pedig a hidroxiláz komponensre, ahol az oxigén vízzé redukálódik (7. ábra B). Viszont ha jelen van egy szénhidrogén szubsztrát, akkor a regulátor komponens összekapcsolja a NADH oxidációját a szubsztrát hidroxilálásával (7. ábra A). Ily módon tehát a regulátor protein képes összekapcsolni az sMMO oxidáz aktivitását a hidroxiláz aktivitással (amikor szénhidrogén szubsztrát rendelkezésre áll) (Liu és mtsai., 1997). Megfigyelték, hogy MMOB képes autokatalitikus proteolízisre, elveszítve ezzel 12 aminosavat az N-terminális végről, ebben a formában az sMMO komplex inaktív. A proteolitikus aktivitásnak szabályzó funkciót tulajdonítanak (Callaghan és mtsai., 2002).



7. ábra. Az MMOB hatása sMMO *in vitro* aktivitására.

A **reduktáz komponens** (MMOC (38,5 kDa)) egy vas-kén flavoprotein, ami egy [2Fe-2S]-centrumot és egy fél flavin adenin dinukleotidot (FAD) tartalmaz molekulánként. Folyamatosan szállít elektronokat a hidroxiláz komponensre, amely elektronok a NADH oxidációjából származnak. Ez az oxidáció két elektront eredményez, amelyek egyesével adódnak át a FAD-nak. Az első elektron redukálja a FAD-ot, ahonnan egy molekulán belüli transzport során a vas-kén centrumra adódik, innen pedig szállítódik tovább a hidroxiláz komponensre, a metán oxidációjához (8. ábra) (Colby és Dalton, 1978).



8. ábra. Az elektron áramlás MMOC és MMOA között.

Ismert, hogy az sMMO komplexet gátolja a réz-ionok jelenléte. A réz-ionok irreverzibilisen kötődnek a reduktáz komponenshez (MMOC), melynek szerkezete ezáltal erősen megváltozik, elveszti a vas-kén centrumát. Ez a szerkezeti változás elzárja az elektrontranszport útját a NADH-ról a hidroxilázra, ezáltal megszünteti az sMMO aktivitását (Green és *mtsai.*, 1985).

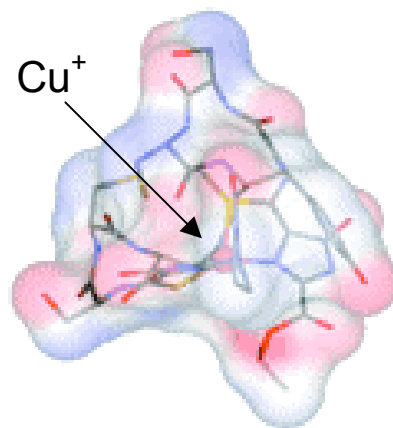
MMOD, az inhibitor fehérje. Minden sMMO-t kódoló operon tartalmaz egy eddig *mmoD*-nek nevezett gént, melynek sokáig nem volt ismert a funkciója. Merkx és Lippard (Merkx

és Lippard, 2002) megállapították, hogy habár nagyon kis mennyiségben, de ez a fehérje (MMOD) is termelődik *in vivo* a *M. capsulatus* (Bath) törzsben. *In vitro* kísérletek azt mutatták meg, hogy az MMOD inhibitorként hat az sMMO hidroxiláz komponensén. Az MMOD az MMOB-val megegyező erősséggel kötődik a hidroxiláz komponenshez. Fiziológias funkciója eddig nem bizonyított.

1.8. A réz-ion anyagcsere

A *M. capsulatus* (Bath) és a *M. trichosporium* Ob3B törzsekkel végzett kísérletek során hamar rájöttek, hogy a sejtek környezetében található réz-ionok mennyisége globális hatással van a sejtek anyagcseréjére. A két enzim kifejeződésének vizsgálata során kiderült, hogy magas réz-ion koncentrációnál pMMO szintetizálódik, alacsony réz-ion koncentráció esetén az sMMO kifejeződése igen jelentős, a teljes sejt fehérje mennyiség harmadát kiteszi. A sejtek környezetében megtalálható réz-ionok mennyisége nemcsak az MMO-k bioszintézisét befolyásolja, hanem hatással van egy sor más fiziológias folyamatra is pl.: belső membránrendszer bioszintézise, legalább két formaldehid dehidrogenáz szintézise és más réz-ion transzporttal és szabályozással kapcsolatban álló polipeptidek bioszintézise (Peltola és mtsai., 1993). Maga a pMMO enzim is főként a magas réz-ion koncentráció esetén szintetizálódó belső membránrendszerben foglal helyet.

A metanotrófokban a metán oxidációhoz általában négyszer annyi réz-ion szükséges, mint vas-ion (Stanley és mtsai., 1983). Ez a magas (egyébként toxikus) réz-ion mennyiség feltételezi egy specifikus réz-ion szállító mechanizmus meglétét, ami egyben védi a sejt többi részét a réz-ionok mérgező hatásától. Korábban számos kis molekulatömegű rézkötő anyagot tisztítottak a metanotrófok tápoldatából, de egységes szerkezetet nem sikerült meghatározni. Kim és munkatársai (Kim és mtsai., 2004) nemrég meghatározták a *M. capsulatus* (Bath) és a *M. trichosporium* Ob3B tápoldatában található réz-ion kötő molekulát, amely rézmentes körülmények közt termelődik leginkább. Meghatározták a vegyület pontos szerkezetét és a szerkezeti hasonlóságok alapján metanobaktinnak nevezték el (9. ábra). Egy metanobaktin molekula egy rezeset köt Cu^+ ion



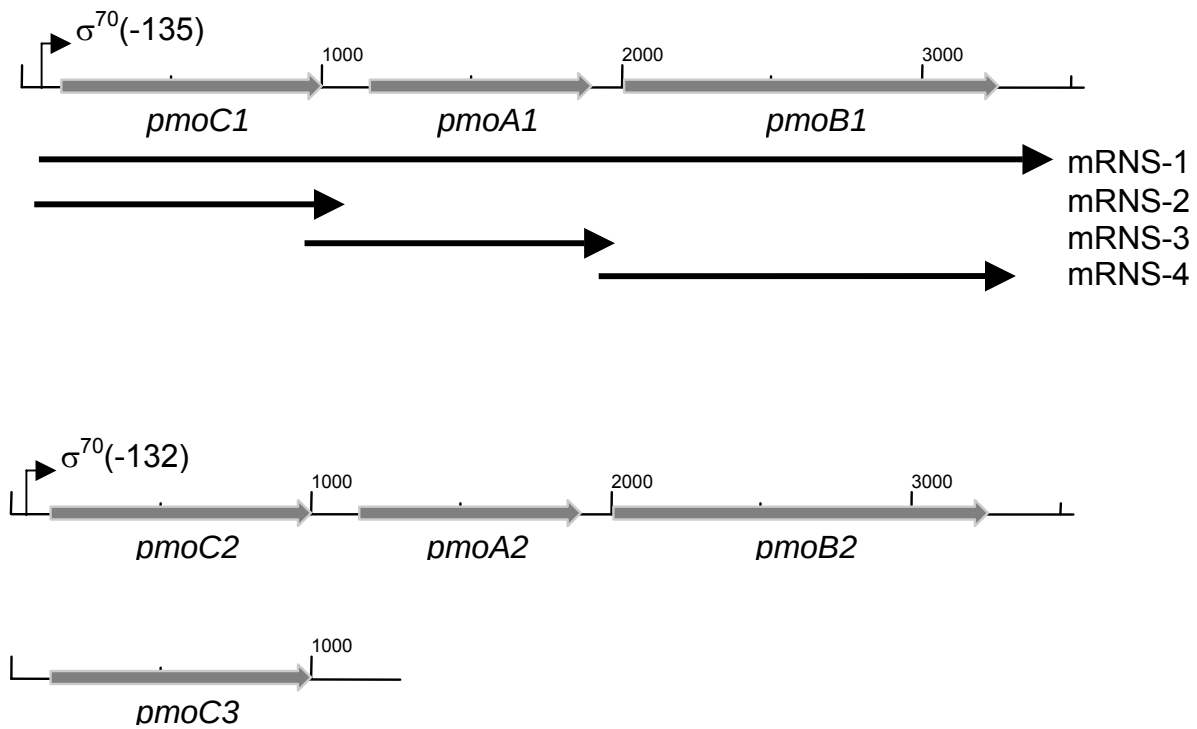
9. ábra. A metanobaktin szerkezete.

formájában (1215 Da). A kötött réz-iont tartalmazó metanobactint a sejtek nagyon gyorsan felveszik eddig tisztázatlan mechanizmussal. A sejtek belsejében történő réz-ion szállítás részletei még nem ismertek. Kao és munkatársai nemrég a cICAT (cleavable Isotope-Coded Affinity Tag) módszer segítségével mennyiségi proteom analízist végeztek összehasonlítva a magas és alacsony réz-ion tartalom mellett növesztett *M. capsulatus* (Bath) tenyészetekben kifejeződő fehérjéket. Munkájuk során 682 fehérjét azonosítottak és legalább 60 fehérje indukálódott réz-ionok hatására, ugyanekkor 68 fehérje relatív mennyisége csökkent (Kao és mtsai., 2004).

1.9. A *pmo* és *smmo* gének és transzkripció szabályozásuk

Bizonyos metanotróf törzsekben a pMMO mellett sMMO is található függetlenül attól, hogy α vagy γ proteobaktériumok csoportjába tartozik-e az adott törzs. Az sMMO-t tartalmazó metanotrófokban fellelhető érdekes és nagyon szigorú rézfüggő regulációt már számos munka keretében próbálták felderíteni, de a szabályozás részletei és az ebben résztvevő gének, fehérjék mind a mai napig feltáratlanok maradtak.

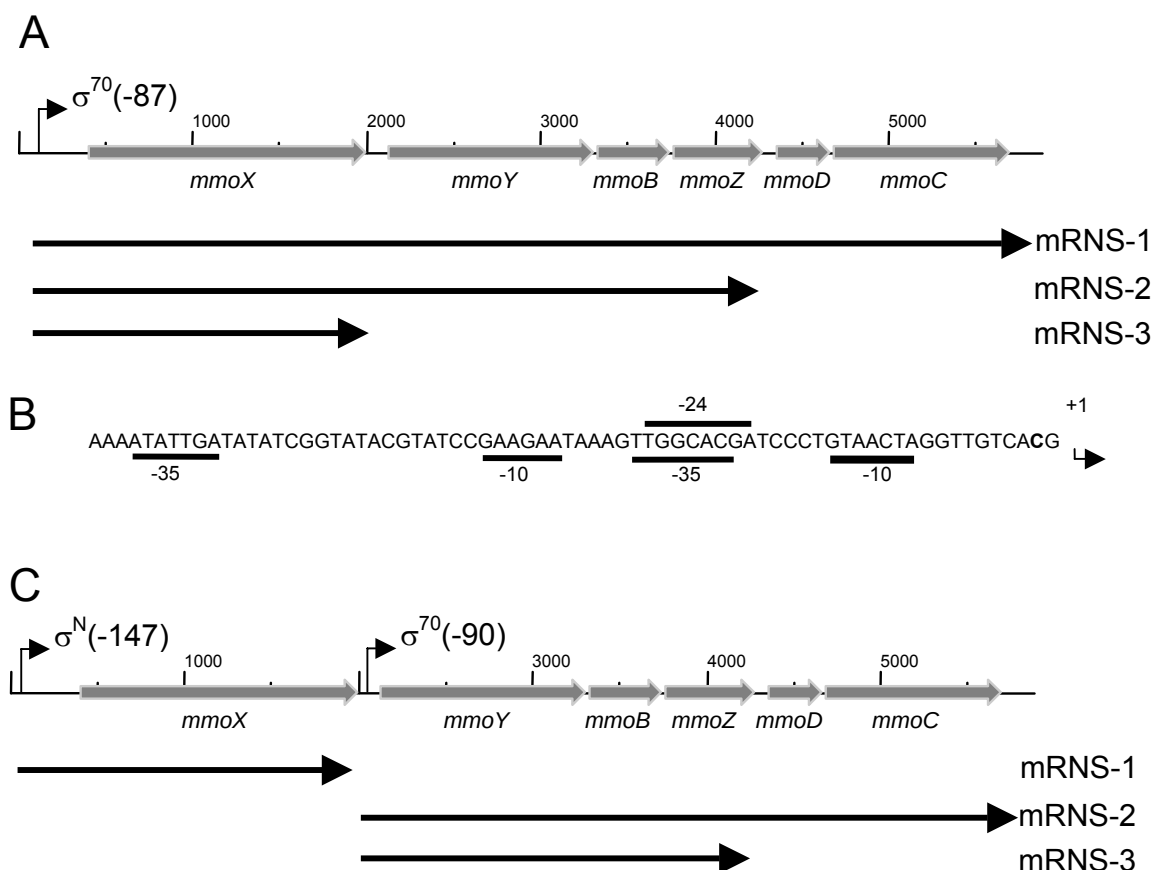
A *M. capsulatus* (Bath) *pmo* operonokat klónozták és meghatározták a nukleotidszekvenciáját (Semrau és mtsai., 1995). Az operon három nyitott olvasási keretből áll (*pmoA*, *pmoB*, *pmoC*). Az alegységeket kódoló gének két példányban találhatók meg a genomban, melyek mindössze 13 bázispárban térnek el egymástól. A *pmoC*-t pedig egy harmadik példányban is megtalálták (Stolyar és mtsai., 2001). A pMMO bioszintézise szintén rézszabályozott. A két *pmoCAB* operon 5' régiójában σ^{70} típusú promótereket jelöltek ki (-10 (TAGACT), -35 (TTGACA)) és meghatározták a transzkripció start helyeket (10. ábra) (Nielsen és mtsai., 1997). Több különböző méretű mRNS-t azonosítottak Nielsen és munkatársai. A 2, 3 és 4-es számú mRNS-ekről valószínűsítik, hogy az mRNS-1 érése során keletkeznek. Choi és munkatársai (Choi és mtsai., 2003a) megállapították, hogy a pMMO teljesen rézmentes tápoldatban növesztett sejtek esetén is kifejeződik, habár nagyon alacsony szinten.



10. ábra. A *M. capsulatus* (Bath) *pmo* operonok.
A nyilak a σ^{70} típusú promótereket jelölik, zárójelben a start kodonhoz viszonyított távolság van jelölve.

Az α -proteobaktériumok csoportjába tartozó *M. trichosporium* Ob3B törzsben is megtalálható egy, a *M. capsulatus* (Bath) *smmo* operonjához nagyon hasonló *smmo* operon. *M. trichosporium* Ob3B szintén rézfüggő módon szabályozza a sejtben kifejeződő sMMO és pMMO mennyiségét. Habár a két törzs sMMO aminosav sorrendje 63%-ban azonos, eltérések tapasztalhatók az operon transzkripciójában. A *M. trichosporium* Ob3B törzsben az *smmo* operonban feltételeznek még egy σ^{70} típusú promótert az *mmoX-mmoY* intergenikus régióban (Stafford és mtsai., 2003). Az *smmo* génekről csak réz-ion mentes környezetben ($<0,2 \mu\text{M Cu}^{2+}$) keletkezik mRNS, $1 \mu\text{M CuSO}_4$ tartalmú tápoldatban nincs detektálható mennyiségű *smmo* mRNS.

A *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 (11. ábra A). Meghatározták a transzkripció start helyet is az *mmoX* 5' régiójában, 87 bp-ra az *mmoX* start kodonjától. Az *mmoX* promóter régiójában több σ^{70} és σ^N típusú promóterekre jellemző -10, -35, -12 és -24-es motívumot azonosítottak. Nielsen és munkatársai (Nielsen és mtsai., 1997) végső konklúzióként σ^{70} típusú promótert tételeztek fel (11. ábra B).



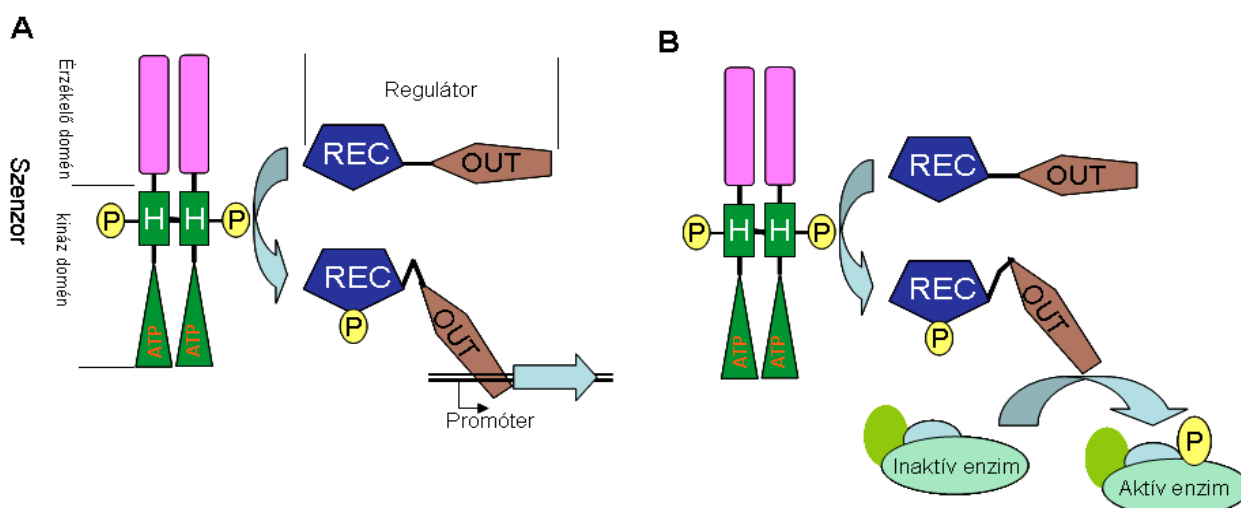
11. ábra. (A) A *M. capsulatus* (Bath) *smmo* operon és *mmoX* promóterről átíródó mRNS-ek,.
(B) A *M. capsulatus* (Bath) σ^{70} promóter régió bázissorrendje és promóter motívumok,
(C) A *M. trichosporium* OB3b *smmo* operon és *mmoX*, *mmoY* promóterekről átíródó mRNS-ek.
Zárójelben a start kodonokhoz viszonyított távolság van feltüntetve.

A *M. trichosporium* Ob3B törzsben Nielsen és munkatársai egyértelműen azonosítottak egy σ^N típusú promótert 147 bázispárra, 5' irányban az *mmoX* start kodonjától, valamint egy σ^{70} típusú promótert az *mmoX*-*mmoY* intergenikus régióban. A *M. trichosporium* Ob3B *smmo* operonjáról átíródó mRNS-ek ennek megfelelően különböznek a *M. capsulatus* (Bath) törzs *smmo* mRNS-eitől (11. ábra C).

Már 1992-ben izoláltak olyan *M. trichosporium* Ob3B mutánst, amely konstitutívan expresszált aktív sMMO enzimet magas réz koncentráció mellett. Mivel a mutagenézist diklórmetánnal végezték, a pontmutáció(k) pontos helye(i) nem volt(ak) azonosítható(k) (Fitch és *mtsai.*, 1993). A mutánsok fenotípusos elemzése alapján feltételezhető, hogy a mutánsok réz felvevő rendszere és a pMMO-sMMO transzkripció szabályozás is sérült (Phelps és *mtsai.*, 1992).

1.10. Két-komponensű szenzor-regulátor rendszerek

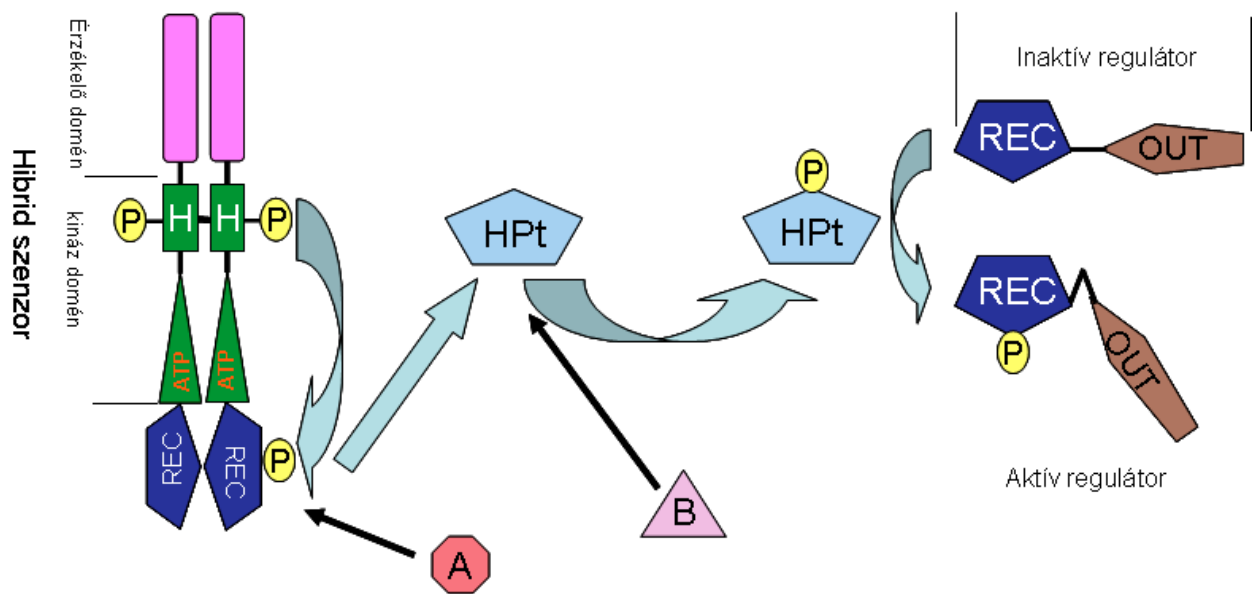
A baktériumsejteket rengeteg külső hatás éri, melyek befolyásolják anyagcseréjüket. A legtöbb esetben a külső hatásra adott válasz olyan gének transzkripciójának aktivációjában nyilvánul meg, melyek segítségével a sejt a külső hatásra reagál. Baktériumokban a legelterjedtebb ilyen jelátviteli rendszerek, az ún. két-komponensű szenzor-regulátor rendszerek, melyek egy szenzor és egy regulátor fehérjéből állnak (Hoch, 2000). A legtöbbször dimerként jelen levő szenzor (Hisztidin kináz, H) egy specifikus jelet érzékel, a jel hatására foszforilációs állapota megváltozik és a szenzor egy speciális hisztidin aminosavjáról a foszfát csoport (P) átkerül a regulátor (Response Regulator, RR) fogadó (RECeiver) aszparagin aminosavjára (His-Asp foszfortranszfer). A foszforiláció hatására a regulátor molekula effektor doménjének aktivitása megváltozik (OUT). A regulátor fehérjék általában transzkripció faktorok, melyek közvetlenül a DNS-hez kötődnek (12. ábra A). Más esetekben a RR molekula valamely enzim aktivitását változtatja meg foszforiláció útján (12. ábra B).



12. ábra. Az egyszerű szenzor–regulátor rendszerek: (A) a regulátor egy transzkripció faktor, (B) a regulátor más enzimet aktivál.

A két-komponensű rendszerek bonyolultabb formáját képviselik az ún. foszforelay rendszerek, melyek nem csak egy szenzor és egy regulátor tagból állnak, hanem további regulátor és foszfortranszferáz doméneket is tartalmaznak (13. ábra), és gyakran nem csak két fehérjéből állnak (His-Asp-His-Asp foszfortranszfer) (Hoch, 2000). A foszforelay rendszerekben megtalálható az ún. hisztidin tartalmú foszfortranszfer protein (HPT), ami néha nem mint különálló fehérje jelenik meg, hanem mint a szenzor molekula doménje. Ezek a kiegészítő domének lehetőséget nyújtanak a jelátvitel finomabb szabályozására további szabályozási pontként szolgálva. A legtöbb foszforelay rendszerben a szenzor egy hibrid szenzor molekula mely a RR-ra és a HPT-re jellemző doméneket is tartalmaz.

Gram-negatív baktériumok közül az *Escherichia coli*-ban (*pcoS-pcoR* és *cusR-cusS*) és *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* törzseiben (*copS-copR*) írtak le olyan két-komponensű szenzor-regulátorokat, melyek a környezet réz-ion tartalmát érzékelik és a réz-rezisztenciáért felelős gének transzkripcióját szabályozzák. Mindhárom rendszer az egyszerű, kéttagú, két-komponensű szenzor-regulátorok csoportjába tartozik. A regulátorok DNS-kötő motívumot tartalmaznak, melyek a szabályozott σ^{70} típusú promóterek -35-ös régiójának, 3' részében található ún. „copper-box” speciális, palindrom DNS motívumhoz kötnek. A copper-box-hoz hasonló DNS motívumot sem az *smm* sem a *pmo* operonok promóter régiójában nem azonosítottak.



13. ábra. A foszforelay rendszerek működésének sematikus rajza.
Az A és B jelű enzimek befolyásolhatják a foszforelay rendszer működését.

1.11. *A M. capsulatus (Bath) genom*

2004 szeptemberében publikálták Ward és munkatársai a *M. capsulatus* (Bath) teljes genom szekvenciáját (Ward és mtsai., 2004). A 3304697 bp hosszúságú genomban 3120 olyan nyitott leolvasási keretet azonosítottak, amelyek fehérjét kódolhatnak. Csak 1875 kódoló régió mutat nagy hasonlóságot már ismert fehérjékhez, míg 514 feltételezett fehérje ismeretlen funkciójú, de konzervált más baktériumokban is. 504 nyitott leolvasási keret teljesen ismeretlen, nem konzervált fehérjét kódolhat. Két különböző típusú feltételezett réz-transzport rendszer génjeit azonosították: 12 P-típusú ATPáz és 18 réz-ion efflux komplex rendszer génjeit. Nem találtak a az *E. coli* *cusSR* és *Pseudomonas* *pcoSR* réz-érzékelő két-komponensű rendszerekhez hasonló géneket (Ward és mtsai., 2004).

A fenti adatokból látható, hogy csupán a fehérje aminosavsorrend hasonlóságok alapján nem lehet megtalálni a *M. capsulatus* (Bath) genomjában a réz érzékeléséért és a rézfüggő szabályozásért felelős géneket. Az is kitűnik, hogy a feltételezett fehérjék mintegy harmada teljesen ismeretlen funkciójú, csakúgy mint más baktériumok esetén, ahol szintén nagy számban találunk teljesen ismeretlen funkciójú, eddig ismeretlen fehérjéket.

1.12. *A metanotrófok molekuláris biológiája*

Az utóbbi 20 évben jelentős mennyiségű fiziológiai és biokémiai információ gyűlt össze a kizárólag metánon élő baktériumokról. Lassú növekedésük miatt ezen organizmusok genetikája kevésbé fejlődött. Genetikai vizsgálatok kivitelezéséhez elengedhetetlenül szükséges a géntranszfer rendszerek kifejlesztése és mutánsok izolálásának lehetősége. A génklónozó eljárások és széles gazdaspecifitású vektorok fejlődésének következtében a metanotrófok molekuláris genetikai vizsgálata napjainkban felgyorsult.

1.12.1. Mutagenézis

A genetikai vizsgálatok mutánsokat igényelnek. Metanotrófokból rendkívül nehéz megfelelő gyakorisággal mutánsokat izolálni. A spontán mutációk gyakoriságának növelésére tett kísérletek nem jártak sikerrel UV sugárzás, etil-metán-szulfonát, nitrozoguanidin stb. esetében. Kimutatták, hogy a *Methylococcus* és *Methylomonas* törzsek rendkívül nehezen mutagenizálhatók (Williams és mtsai., 1977).

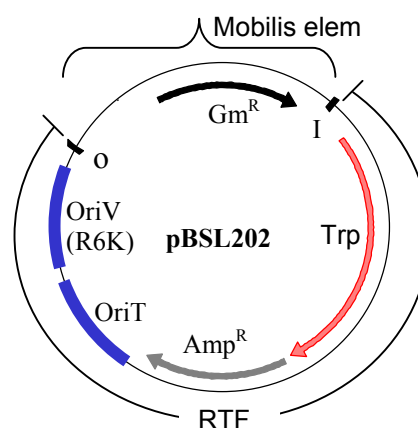
Néhány faj (pl.: *Methylosinus trichosporium* OB3b és a *Methylomicrobium album* BG8) adaptálható metanolon való növekedésre. Így lehetővé válik a metán oxidáló enzimek mutagenézise diklórmétán (DCM) segítségével. A diklórmétán egyrészt mutagén hatású,

másrészt az MMO által a sejt számára mérgező szén-monoxiddá alakul, amely megöli a sejtet. A DCM ezen tulajdonságait felhasználva előállítottak olyan mutánsokat, melyek sMMO-t termelnek, akkor is, ha a tápközegben a réz mennyisége a pMMO kifejeződését tenné lehetővé (Phelps és mtsai., 1992).

Stabil mutánsok előállítására lehetőség nyílik transzpozonok alkalmazásával, illetve irányított mutagenézissel. Ehhez szükség van a megfelelő vektorok hatékony bejuttatására a sejtekbe.

1.12.2. Mini-transzpozonok

A mini-transzpozonok mesterségesen előállított DNS konstrukciók. Két, fordítottan ismétlődő szekvencia (I-O) között található DNS szakasz egy antibiotikum-rezisztencia gént tartalmaz (mobilis elem). A mini-transzpozont hordozó plazmid replikációs origója (OriV), transzfer origója (OriT) és a kivágódásért felelős transzpozáz enzimet kódoló gén (Trp) a fordítottan ismétlődő szekvenciákon „kívül”, a Rezisztencia-Transzfer-



14. ábra. A mini-transzpozon vázlatos rajza.

Funkciós régióban (RTF-régió) foglal helyet (14. ábra). A mini-transzpozont hordozó plazmid a transzfer origónak köszönhetően konjugációval átjuttatható a megfelelő sejtbe, ahol a szűk gazdasepecifitású replikációs origó miatt nem replikálódik. A kivágódás után a transzpozon random módon beintegrálódik a fogadó (recipiens) sejt genomjába, többször nem ugrik, és nincs ugrás az utódsejtekben sem, mivel a transzpozáz génjét is tartalmazó RTF-régió eliminálódik a leánysejtekből.

1.12.3. DNS beviteli rendszerek

A rendelkezésre álló lehetőségek meglehetősen szűkösek vagy kis hatékonyságúak. Az első próbálkozások egy transzformációs rendszer kidolgozására *M. capsulatus* (Bath) törzsben történtek (Murrell, 1992). A módszer nagy koncentrációjú lineáris DNS-t ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) igényelt és a DNS-t egy egész sejtcikluson keresztül (kb. 3 óra) kellett a sejtekkel együtt inkubálni. Így 10^{-9} - 10^{-10} gyakorisággal kaptak transzformánsokat abban az esetben, ha a sejtek megfelelően növekedtek a kísérlet tartama alatt. Cirkuláris plazmidok esetén a transzformáció sikertelen volt. Transzdukciós rendszer mind a mai napig nincs metanotrófok esetében, habár már ismerünk néhány csak metanotrófokra specifikus fagot, ezeknek viszont túl szűk a gazdaspecifitásuk

ahhoz, hogy általánosan használhatóak legyenek. Egy másik ígéretes lehetőség az elektroporáció, de metanotrófokban eddig ez a módszer is sikertelennek bizonyult.

Metanotrófok esetében a legeredményesebb DNS-beviteli rendszer a konjugáció. A különböző vektorok lehetővé teszik mind plazmidok, mind a kromoszóma mobilizációját. Az irodalomból ismert módszerekkel a konjugációs gyakoriság 10^{-8} - 10^{-10} közt változik. A konjugációs gyakoriság nagymértékben függ az alkalmazott törzsektől, vektoroktól, a konjugáció körülményeitől. Többféle konjugációs módszert dolgoztak ki és alkalmaztak metanotrófokra (Martin és Murrell, 1995), de a hatékonyság túl alacsony volt megfelelő számú transzpozonos mutáns előállításához. Jelentős eltéréseket tapasztalhatunk a konjugációs gyakoriságot illetően még akkor is, ha csak a konjugációs technikát változtatjuk, minden más (vektorok, sejtek, egyéb körülmények) azonos (Murrell, 1992).

Célkitűzések

2.1. Általános célkitűzések

A szolubilis metán monooxygenáz enzimek egyedülálló katalitikus aktivitásuk révén számos környezetkímélő és gazdaságos biotechnológiai eljárásban használható lehetséges katalizátorok. Gazdaságos és széleskörű felhasználásuknak gátat szab az enzim réz-ionokkal szembeni érzékenysége, valamint az enzim kifejeződésének gátlása réz-ion jelenlétében. Az sMMO szabályozási mechanizmusának ismeretében lehetőség nyílt 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 érzékenységevel kapcsolatos anyagcsere útról 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 rézfüggő szabályozásért felelős gének megtalálására, valamint az ismeretlen funkciójú, feltételezett gének szerepének megismerésére.

2.2. Részletes célkitűzések

1. Az *mmoX* promóter *in silico* vizsgálata.
2. Az *smmo* operon lehetséges promóter régióinak azonosítása.
3. Az *mmoX* promóter aktivitáshoz nélkülözhetetlen régiók azonosítása promóter próba vektorral
4. Az *smmo* operon környező génjeinek klónozása, bázissorrend meghatározása, *in silico* analízise
5. Az azonosított gének mutagenézise, a mutánsok fenotípusos vizsgálata, tekintettel az sMMO kifejeződésének megváltozására.
6. A *M. capsulatus* (Bath) törzsre konjugációs génbeviteli rendszer optimalizálása.
7. Transzpozonos mutagenézis kidolgozása *M. capsulatus* (Bath) törzsre.
8. Az sMMO kifejeződését befolyásoló mutációk létrehozása és a mutációk helyének azonosítása transzpozonos mutagenézissel.

Anyagok és módszerek

3.1. Tápoldatok és felhasznált baktérium törzsek

A munkám során felhasznált baktérium törzsek a 3. táblázatban vannak feltüntetve. A *M. capsulatus* (Bath) törzseket rutinszerűen Nitrate Mineral Salt (NMS) tápoldatban tenyésztettem. NMS: 10 mM KNO₃; 4 mM MgSO₄·7H₂O; 1,36 mM CaCl₂·2H₂O; 2 mM KH₂PO₄; 2 mM Na₂HPO₄; 3,3 μM FeSO₄·6H₂O; 10 μM Fe-EDTA; 1,4 μM ZnSO₄·7H₂O; 0,1 μM MnCl₂·4H₂O; 0,24 μM H₃BO₃; 1 μM NaMoO₄·2H₂O; 0,3 μM CoCl₂·6H₂O; 1 μM NiCl₂·6H₂O; 0,67 μM Na-EDTA. Réz-ionokat tartalmazó tápoldat elkészítéséhez 5 μM CuSO₄-ot adtam a médiumhoz, míg a rézmentes tápoldat nem tartalmazott hozzáadott réz-szulfátot. A szilárd táptalaj elkészítéséhez 1,5% (m/v) agart (GIBCO) adtam az NMS médiumhoz. Petri-csészéket anaerosztátban, 50% (v/v) levegő, 48% (v/v) metán és 2% (v/v) széndioxid atmoszféra alatt inkubáltam 5-8 napig, míg a baktérium telepek kifejlődtek. A folyadékkultúrákat 500 ml térfogatú Erlenmeyer lombikban 60 ml NMS tápoldatba tenyésztettem 50% (v/v) levegő, 48% (v/v) metán és 2% (v/v) széndioxid tartalmú gáztérben. A Suba-Seal gumidugóval lezárt lombikokat 43°C-on, rázatva (200-250 rpm) inkubáltam 16-24 órán keresztül. *Escherichia coli* törzseket LB tápoldatban 37°C-on növesztettem az egyes törzseknek megfelelő antibiotikumokkal kiegészítve: ampicilin (Ap, 100 μg ml⁻¹), kanamicin (Km, 25 μg ml⁻¹), gentamicin (Gm, 15 μg ml⁻¹) és streptomycin (Sm, 25 μg ml⁻¹).

3.2. A konjugáció

Idegen DNS bejuttatását *M. capsulatus* (Bath)-ba szilárd felületen történő konjugációval végeztem. A bejuttatni kívánt vektorokat először *E. coli* S17-1 λ pir mobilizáló törzsbe (Herrero, és mtsai., 1990) transzformáltam. A transzformáns törzseket használtam donorként a konjugációban. A donor (*E. coli*) és a recipiens (*M. capsulatus* (Bath)) sejt kultúrákat 5×10⁸ sejt ml⁻¹ sűrűségig növesztettem, 2 ml donor és 30 ml recipiens sejt kultúrákból a sejteket és a tápoldatot elválasztottam centrifugálással (16000×g, 3 perc), a sejteket antibiotikum mentes tápoldatokban szuszpendáltam. Ezt a műveletet kétszer megismételtem, eltávolítva így a törzsek növesztésénél használt antibiotikumokat. Mindkét sejtípust ismét lecentrifugáltam, és 200-200 μl NMS-ben szuszpendáltam. A sejtsuszpenziókat összekevertem, és egy 0,2 μm pórusméretű nitrocellulóz szűrőre (Reanal) cseppentettem. A baktériumokat tartalmazó szűrőt egy olyan NMS táplemezre helyeztem, ami 0,2% (v/v) proteóz peptont (Reanal) is tartalmazott az *E. coli* törzs számára. A lemezeket 37°C-on 16 órán keresztül inkubáltam 50% (v/v) levegő, 48% (v/v) metán és 2% (v/v) széndioxid atmoszféra alatt. A baktériumokat a filterről 1 ml NMS-sel

lemostam és szuszpendáltam. A sejtsuszpenzióból 30-500 μl -t szelektív, antibiotikumot tartalmazó NMS táplemezre szélesztettem, 50% (v/v) levegő, 48% (v/v) metán és 2% (v/v) széndioxid atmoszféra alatt inkubáltam 43°C-on 5-10 napig. A keletkezett *M. capsulatus* (Bath) transzkonjugánsokat újból átoltottam NMS táplemezre, hogy az esetlegesen túlélő *E. coli* sejteket eltávolítsam.

3.3. sMMO aktivitásmérés

3.3.1. sMMO aktivitásfestés folyadék kultúrában

A *M. capsulatus* (Bath) folyadék kultúrák sMMO aktivitását a naftalin oxidációs módszerrel vizsgáltam. A kultúrákból 5-5 ml-t, 1-1 steril szcintillációs küvettába pipettáztam melyekbe előzőleg 50 mg összetört naftalin kristályt helyeztem. A kultúrákhoz hozzámértem 20 μl 1M Na-formátot majd 43°C-on, 1 óráig rázatva inkubáltam. Az inkubációs idő lejárta után a sejteket és a naftalin kristályokat centrifugálással eltávolítottam és a tiszta felülúszókból 1-1 ml-t egy tiszta küvettába pipettáztam. A keletkezett 1-naftol detektálására TOD 50 mg ml^{-1} -es oldatát használtam, melyből 10 μl -t kevertem 1 ml felülúszóhoz. Az aktív sMMO enzim a naftalint 1-orto-naftollá oxidálja, ami TOD-dal lila színű vegyületet képez, így lilára színezi a sejteket. A keletkezett lila színű vegyületet spektrofotometriásan lehet mérni az 530 nm-en történő elnyelése alapján. Három független mérés eredményének szórását tüntettem fel az ábrákon.

3.3.2. sMMO aktivitásfestés lemezen

A festeni kívánt kolóniákat naftalin kristály jelenlétében 2 órán keresztül 43°C-on inkubáltam. Ezután 1-2 ml TOD oldatot (50 mg ml^{-1}) szélesztettem a lemezekre. Az sMMO aktivitással rendelkező telepek lila színűek lettek.

3.4. GFP fluoreszcencia mérése

GFP fluoreszcenciát a különböző *M. capsulatus* (Bath) törzseken Qanta Master QM-1 fluoriméterrel (Photon Technology International), 490 nm-es hullámhosszon gerjesztve, 510 nm-en mértem, 8 nm-es rést használva. Az intenzitásokat önkényes egységekben tüntettem fel 10^8 sejt ml^{-1} sejtsűrűségre normalizálva. Három független mérés szórását tüntettem fel az ábrákon.

3.5. SDS-PAGE és Western hibridizáció

M. capsulatus (Bath) sejteket 10000xg-vel, 10 percig centrifugáltam, majd 1 ml 50 mM Tris-HCl, pH 7,0 pufferben felfuszpendáltam. A sejteket French-Press segítségével tartam fel. A megmaradt egész sejteket centrifugálással távolítottam el (10000xg, 2 perc). A fehérje mennyiségét a BIO-RAD cég fehérje mennyiség meghatározó kitje segítségével mértem. A sejtmentes frakciót, mely tartalmazta a szolubilis és membrán frakciót is 10%-os SDS-poliakrilamid gélen elválasztottam. A gélrt vagy megfestettem Coomassie brilliant blue festékkel, vagy Western hibridizációs kísérletben használtam tovább az sMMO hidroxiláz komponense ellen termeltetett poliklonális ellenanyag segítségével.

3.6. Standard DNS technikák

Felhasznált oldatok:

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

TE puffer: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8,0

TAE: 4 mM Tris-acetát, 1 mM EDTA

TBE: 100 mM Tris-HCl, 100 mM bórsav, 2 mM EDTA pH 8,0

TB: 10 mM PIPES; 55 mM MnCl₂; 15 mM CaCl₂; 250 mM KCl

SOB: 20 g l⁻¹ Bacto trypton, 5 g l⁻¹ élesztő kivonat, 0,5 g l⁻¹ NaCl, 25 mM KCl, 0,1 M MgCl₂

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

SET puffer 20% (m/v) szacharóz, 50 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl

Puffer I: 100 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl

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

Puffer III: 100 mM Tris-HCl pH 9,5, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl₂

3.6.3. Kromoszómális DNS izolálása *M. capsulatus* (Bath) törzsekből

4 ml sejtetkultúrát összegyűjtöttem centrifugálással (10000xg, 3 perc) egyetlen 1,5 ml-es mikrocentrifuga csőben, majd felfuszpendáltam 300 µl SET-ben és hozzáadtam 100 µl 20% (m/v)-os SDS-t valamint 20 µl 40 mg ml⁻¹-es Proteináz K oldatot, majd egy órán keresztül 55°C-on inkubáltam. A sejtek lizálása után 100 µl 5 M-os NaCl oldatot és 80 µl 10% (m/v)-os CTAB oldatot adtam a mikrocentrifuga csőbe és 10 percig 65°C-on inkubáltam, majd 600 µl kloroformmal extraháltam a felülúszót. Az extrakciót még egyszer megismételtam 500 µl kloroform-fenol 1:1 arányú elegyével, majd a már tiszta felülúszóhoz 500 µl izopropanolt adva a

kicsapódott genomi DNS-t centrifugáltam. A DNS csapadékot kétszer mostam 1,5 ml 70% (v/v)-os, -20°C-os etanollal és szárítás után 50 µl TE pufferben feloldottam.

3.6.4. Southern hibridizáció

3.6.4.1. Digoxigeninnel jelölt próba készítése

A Southern hibridizáció során felhasznált próbákat PCR segítségével jelöltem digoxigenin (DIG) molekulához kötött dUTP nukleotid beépítésével. Az adott próbát megfelelő PCR primerekkel (3. táblázat) szaporítottam fel, olyan reakcióelegyben, mely 0,2 µl 2 mM-os DIG-dUTP-t is tartalmazott.

3.6.4.2. Southern blot, hibridizálás és detektálás

Emésztett genomi DNS-t 1%-os agaróz gélen választottam el, majd a gélben a DNS darabokat részlegesen depurináltam 0,25 M sósavban, 15 percig. A gél után 30 percig denaturáló oldatban (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl), 30 percig neutralizáló oldatban (1 M Tris-HCl pH 8,0, 1,5 M NaCl) inkubáltam. Ezt követően kapilláris transzferrel HybondN+ (Amersham) membránra vittem át a DNS-t. A membránokat 1 percig 6xSSC-ben mostam, szárítottam, majd a DNS-t keresztkötöttem a membránnal UV fényben 2 percig. A membránt előhibridizáltam 68°C-on 1 óráig, hibridizáló oldatban. Az előhibridizálást követően új hibridizáló oldatban hozzáadtam a jelölt, denaturált DNS próbát, és egy éjszakán át hibridizáltam. Másnap 68°C-on kétszer mostam 20 ml 0,1xSSC + 0,1% SDS oldatban 15 percig. A próba detektálását a Roche cég digoxigenin detektáló kitjével végeztem a cég iránymutatásai szerint: A próbával hibridizált membránt 5 percig puffer I-ben ekvilibráltam, majd 45 percig puffer II-ben blokkoltam a nem specifikus kötőhelyeket. Ezt követően 30 percen át inkubáltam puffer II-ben, melyhez alkalikus foszfatázzal kapcsolt digoxigenin ellen termeltetett antitestet adtam 1:2500 hígításban. Az inkubáció letelte után kétszer 15 percig mostam puffer III-ben, ezt követően 5 percig puffer I-ben ekvilibráltam. Végül 1 ml kemiluminescens szubsztrátot (CSPD) szélesztettem a membránokra, a membránokat fóliába csomagolva 37°C-on inkubáltam 15 percig, majd fotókazettába helyeztem és különböző ideig (3-90 perc) röntgen filmmel exponáltam.

3.6.5. Plazmid tisztítás *Escherichia coli*-ből

5 ml felnövesztett sejt kultúrából 3 ml-t centrifugáltam (13000xg, 2 perc), a sejteket felfuszpendáltam 300 µl 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA pH 8,0 oldatban. 300 µl 200 mM NaOH, 1% (m/v) SDS oldattal óvatosan összekevertem. A sejtek lízise után 300 µl 3 M K-acetát, (pH 5,5) hozzáadva, a csapadék képződését segítő, 5 percig, -20°C-on inkubáltam, majd centrifugáltam (13000xg, 10-20 perc). A plazmid DNS-t a felülúszóból 70%(v/v) izopropanollal

kicsaptam a képződött csapadékot centrifugálással összegyűjtöttem (13000xg, 20 perc). A felülúszó eltávolítása után a csapadékot 1 ml 70%(v/v)-os etanollal mostam. Végül a DNS-t szárítottam, majd 30-50 µl vízben oldottam fel.

3.6.6. DNS emésztése restrikciós enzimekkel

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

3.6.7. Agaróz gélelektroforézis

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

3.6.8. DNS izolálása gélből

MBI Fermentas elválasztó kitet használtam: Az agaróz gélben elválasztott fragmenteket pengével kivágtam a gélből és megmértem a gél darabok tömegét, majd a darabokat egy Eppendorf csőbe helyeztem. 6 M NaI oldatból a gél darabok tömegének megfelelő mennyiséget adtam és 55°C-on 5 percig inkubáltam. Az agaróz feloldódása után 2 µl 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 50 µl TE pufferrel, 55°C-on eluáltam a felkötődött DNS-t a szilika porról.

3.6.9. Polimeráz láncreakció (PCR)

A reakciókat Hybaid PCR Express típusú készülékben végeztem. A reakcióelegy az alábbi összetevőket tartalmazta: 3 µl 10x DyNzyme vagy Pwo puffer, 4 µl 2,5 mM-os dNTP, 1-1 µl primer (15 pmol µl⁻¹), 1 µl templát DNS, 20 µl víz és végül 1 U DyNzyme II (FINNZYMES) vagy 1 U Pwo (Roche) enzimet adtam 30 µl 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 ld. 3. táblázat (a primer pároknak megfelelően) 30 másodperc, majd elongáció 72°C, a képződő termék hosszának megfelelően: 1 perc/1 kb DNS, végül egy utolsó elongációs lépés, rendszerint 10 perc, 72°C.

3.6.10. Ligálás

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

3.7. Kompetens sejt készítés kémiai módszerrel

Az *E. coli* XL-1 Blue vagy S17-1 λ pir sejteket 50 ml SOB-ban, 22°C-on $OD_{600}=0,4-0,6$ -ig növesztettem, 10 percig jégen inkubáltam, majd centrifugáltam 2500xg sebességgel, 4°C-on 10 percig. Az összegyűlt sejteket jégen 16 ml TB pufferben szuszpendáltam fel, majd a fentiekhez hasonlóan centrifugáltam. A csapadékot 300 μ l DMSO-t (dimetil-szulfoxid) tartalmazó, 4 ml TB pufferben szuszpendáltam fel és 10 percig jégen inkubáltam, majd 100 μ l-enként előre lehűtött Eppendorf csövekbe szétosztottam. A sejteket folyékony nitrogénbenn való fagyasztás után -80°C -on tároltam felhasználásig (Inoue és *mtsai.*, 1990).

3.8. Transzformálás

A transzformálandó DNS-t 100 μ l kompetens sejthez adtam, melyeket ezután 30 percig jégen inkubáltam. A hősokkot követően (42°C, 45 másodperc) a sejtekhez 800 μ l SOB-t és 20 μ l 1 M-os glükózt adtam, 37°C-on 1 óráig rázatva inkubáltam, végül a megfelelő antibiotikummal kiegészített LB lemezre szélesztettem.

3.9. RNS tisztítás

Az RNS-sel végzett munka során különös figyelmet fordítottam az eszközök és anyagok RNáz mentességére. Minden oldatot RNáz mentes összetevőkből készítettem és RNáz mentes eszközökkel dolgoztam.

4 ml 10^8 sejt ml^{-1} koncentrációjú *M. capsulatus* (Bath) kultúrából tisztítottam RNS-t. A sejteket 12000xg-n 2 percig centrifugáltam, a tápoldat eltávolítása céljából, a sejteket 300 μ l SET pufferben felsuszpendáltam. 300 μ l lízis puffert [20% (m/v) SDS, 1% (m/v) $(NH_4)_2SO_4$, pH 4,8] adtam az oldathoz, majd óvatosan forgatva addig kevertem, míg az oldat fel nem tisztult. 300 μ l telített NaCl oldat segítségével kicsaptam az egyéb sejtalkotókat és a DNS nagy részét. A csapadékot 30 percig 12000xg-n történő centrifugálással választottam el a felülúszótól. Az RNS-t a felülúszóból 500 μ l 2-propanollal csaptam ki, melyet 30 percig centrifugáltam 12000xg-n. Az RNS csapadékot kétszer mostam 70% (v/v)-os -20°C-s etanollal, majd szárítás után 20 μ l vízben oldottam fel újra.

3.10. *mmoX* RT-PCR

A *M. capsulatus* (Bath) törzsekből származó tisztított RNS még tartalmaz genomi DNS szennyeződést ezért az RNS preparátumot DNÁzzal (Amersham) kezeltem a cég útmutatásai szerint. A tisztított RNS mennyiségét meghatároztam, majd 1 µg RNS-hez 30 pmol *mxatgrev* reverz primert adtam (3. táblázat), az elegyet 11 µl-re egészítettem ki vízzel. A mintát 70°C-on inkubáltam 15 percig, majd jégben lehűtöttem. A mintához 4 µl dNTP oldatot, 4 µl M-MLV 5x puffert és 1 U M-MLV reverz transzkriptázt adtam. Az elegyet 37°C-on 1 óráig inkubáltam, majd az enzimet 70°C-on 5 percig inaktiváltam. A reverz transzkripció után a mintából 2,5 µl-t használtam templátként a PCR reakcióban, amit az *mxatgfw* és *mxatgrev* primerekkel végeztem a következő program szerint: 1 ciklus 96°C 10 perc, 35 ciklus 96°C 30 másodperc, 60°C 30 másodperc, 72°C 30 másodperc, és végül egy 10 perces végső elongációs lépés 72°C-on. A PCR terméket agaróz gél-elektroforézissel analizáltam.

3.11. A DNS szekvenciák *in silico* analízise

A GenBank adatbázisban történő homológia kereséseket a BLAST, BLASTX és a BLASTP programok segítségével végeztem (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). A protein motívumokat a SMART programmal azonosítottam (<http://smart.embl-heidelberg.de/>). A promóterek előrejelzését a Neural Network Promoter Prediction algoritmussal végeztem (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html). Az aminosav szekvenciákat a CLUSTAL W program segítségével analizáltam. A TIGR adatbázisban található befejezetlen mikrobiális genomon végzett kereséseket a TIGR BLAST keresőjével végeztem (<http://tigrblast.tigr.org/ufmg/>). Az előzetes *M. capsulatus* (Bath) genom szekvenciát a TIGR honlapjairól töltöttem le (<http://www.tigr.org>). A polipeptidek membrántopológiáját a TMHMM szerver 2.0-ás verziója segítségével határoztam meg (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>).

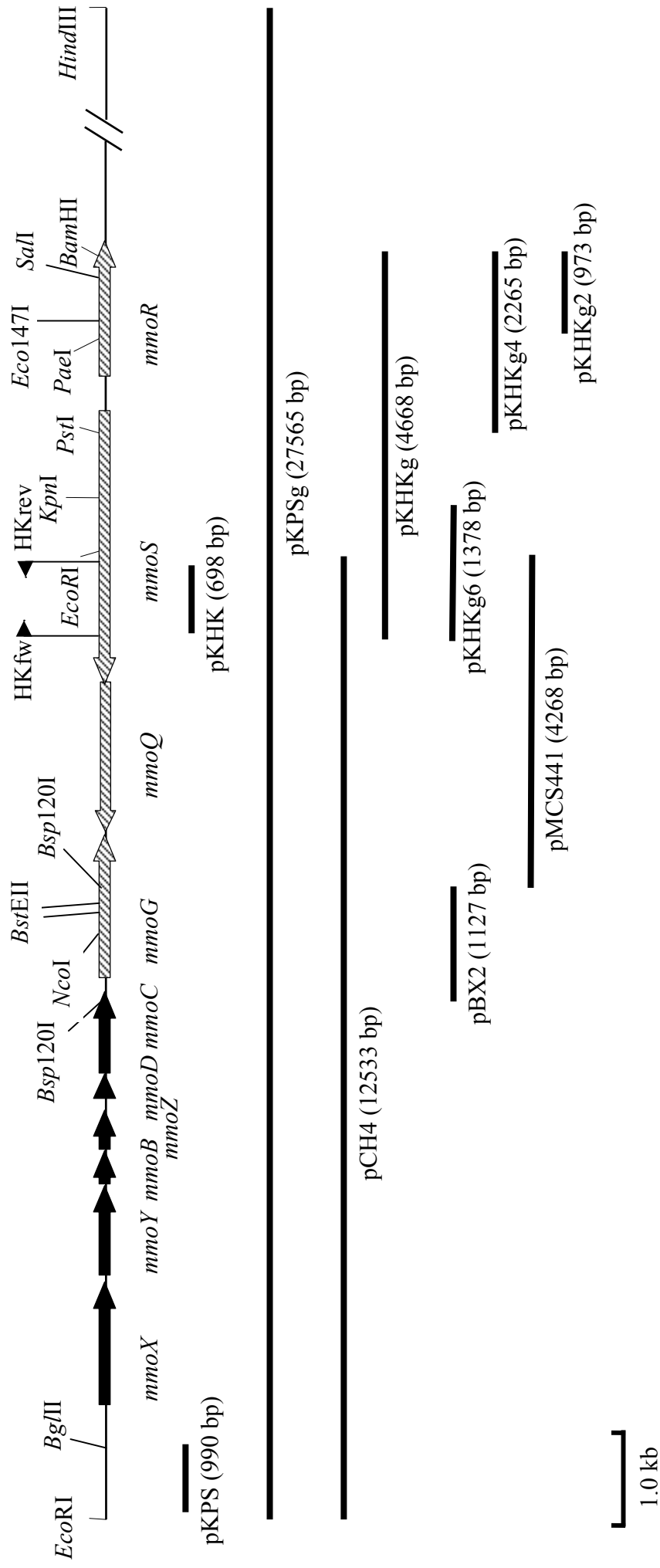
3.12. Az *mmoC* 3' régió klónozása és bázissorrend meghatározása

Az *mmoC* géntől 3' irányban elhelyezkedő 5,4 kb-nyi genomi régiót a pCH4 plazmidon már Stainthorpe klónoztta 1989-ben (Stainthorpe és *mtsai.*, 1990), de ezen régió bázissorrendjét nem határozták meg. A pCH4 plazmidot *Bsp*120I-gyel emésztettem és az 1,1 kb-os és a 4,2 kb-os DNS darabokat gélből izoláltam. A *Bsp*120I emésztés eredményeként létrejövő 9,1 és 3,9 kb-os DNS darabok a már ismert génszakaszokat tartalmazzák. Az 1,1 kb-os darabot *Bsp*120I emésztett pBluescript2SK+ klónozó vektorral ligáltam létrehozva ezzel a pBX2 plazmidot. A pMCS441 nevű plazmid a 4,2 kb-os pCH4 fragment és a *Bsp*120I emésztett pBBR1MCS-4 vektor ligálásával jött létre. Mindkét konstrukció esetén restriktációs emésztésekkel határoztam meg az inszert orientációját. Az inszertek két végének nukleotid sorrendjét a vektorokon

elhelyezkedő univerzális szekvenáló primerek segítségével határoztam meg. Az inszertek további bázissorrendjét úgy határoztam meg, hogy a már ismert bázissorrendű szakasz 3' végéhez közel újabb szekvenáló primereket terveztem és ezeket használva határoztam meg a már ismert szakaszok 3' régióinak nukleotid sorrendjét. Ezt a módszert alkalmaztam addig, míg a két nukleotid sorrend átfedést nem mutatott, meghatározva így a pBX2 és pMCS441 plazmidok inszertjeinek bázissorrendjét egy szálon. A pontos bázissorrend meghatározása érdekében a nukleotid sorrend meghatározását a fent említett módszerrel tovább folytattam, míg az 1,1 és 4,2 kb hosszú DNS darabok bázissorrendjét mind a két komplementer szálon meg nem határoztam. A két szálon előforduló szekvenciabéli bizonytalanságokat újabb szekvenálással pontosítottam.

A DNS szekvenanciaanalízis alapján azt az eredményt kaptam, hogy az *mmoC* gén 3' régiója már ismert génekkel mutat hasonlóságot. Ez alapján látható volt, hogy a két-komponensű szenzor-regulátor génpár szenzor génjének 5' darabja hiányzik a pCH4 plazmidról. A hiányzó DNS darabot a *M. capsulatus* (Bath) genomjából klónoztam a következő módszerrel. *M. capsulatus* (Bath) genomi DNS-ét emésztettem külön-külön *AccI*, *Bsp120I*, *BamHI*, *HindIII*, *KpnI*, *PaeI*, *SalI* és *XhoI* enzimekkel. A szenzor gén meglévő darabjáról specifikus primerekkel megsokszoroztam egy 443 bp-os DNS darabot, amit a PCR reakció közben jelöltem DIG-dUTP-vel. Ezt a jelölt DNS-t használtam próbaként Southern hibridizációhoz az emésztett *M. capsulatus* (Bath) DNS mintákon. Az ismert szekvencia és a Southern hibridizáció során meghatározott restriktions fragment méretek alapján elkészítettem a pCH4 plazmidról hiányzó, szenzor gén 5' végét tartalmazó genomi DNS régió restriktions térképét. Két konstrukciót készítettem, melyek tartalmazzák az *mmoC* géntől 3' irányban elhelyezkedő géneket: pKPSg és pKHKg. Körülbelül 27 kb-nyi *M. capsulatus* (Bath) genomi DNSt klónoztam pK18mob vektorba a következőképpen: A 991 bp-os *EcoRI*-*BglII* emésztéssel készült DNS darabot az *mmoX* 5' régiójából az *EcoRI*-*BamHI* emésztett pK18mob vektorba ligáltam, ezt a plazmidot pKPS-nek neveztem el. pKPS-t konjugációval *M. capsulatus* (Bath)-ba juttattam, a transzkonjugánsokat 20 µg ml⁻¹ kanamicint tartalmazó lemezekon szelektáltam. Mivel a pK18mob nem replikálódik *M. capsulatus* (Bath)-ban, a Km rezisztens kolóniákban a plazmid a homológ rekombinációval beintegrálódott az *mmoX* 5' régiójába. A plazmid megfelelő elhelyezkedését a genomban PCR reakciókkal ellenőriztem. Az így keletkezett *M. capsulatus* (Bath) törzset McKPS-nek neveztem el. McKPS-ből genomi DNS izoláltam és megemésztettem *HindIII* enzimmel. Az emésztett DNS-t ligáltam, ezáltal létrehozva olyan cirkuláris DNS-t mely tartalmazza pKPS-t és a szenzor gén eddig ismeretlen 5' régióját. Az így keletkezett DNS-t *E. coli* törzsbe transzformáltam, restriktions emésztésekkel ellenőriztem és elneveztem pKPSg-nek (15. ábra). pKHKg ugyanilyen módszerrel készült: A szenzor gén ismert részéről a HKfw és HKrw primerek segítségével amplifikált darabot *HincII* emésztett pK18mob-ba klónoztam. A PCR terméket megfelelő orientációban tartalmazó pK18mob plazmidot pKH-nak neveztem el. A

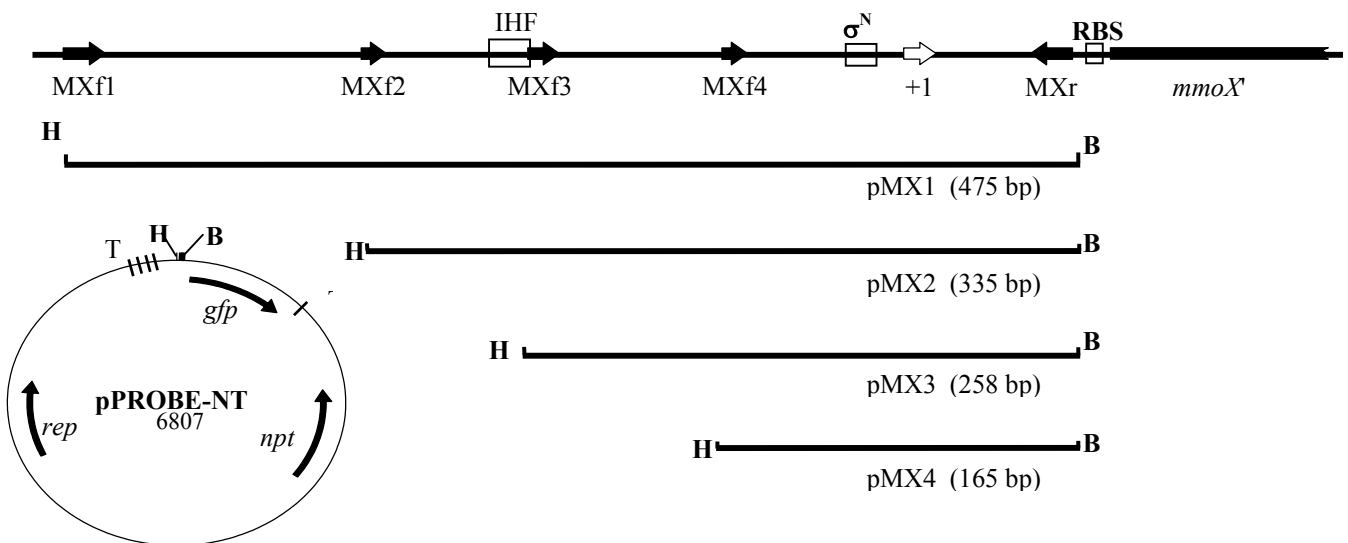
pKHK-t tartalmazó genomi DNSt *Bam*HI-gyel emésztettem és ligáltam, létrehozva ezzel a pKHKg plazmidot (15. ábra). pKHKg konstrukciót emésztettem *Eco*RI, *Pae*I, *Pst*I és *Kpn*I restrikciós enzimekkel. A pK18mob vektort is tartalmazó fragmenteket izoláltam és ligálással cirkularizáltam, létrehozva ezzel a pKHKg1, pKHKg2, pKHKg4, pKHKg6 plazmidokat (15. ábra).



15. ábra. Az *mmoC* 3' régió klónozása.

3.13. A plazmidok készítése

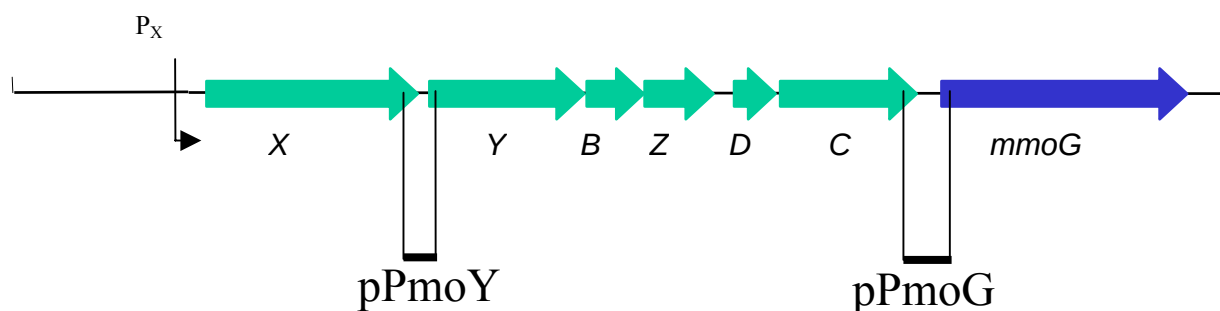
Az *mmoX* gén 5' régiójában található feltételezett promótert pPROBE-NT (Miller és *mtsai.*, 2000) promóter próba vektor segítségével teszteltem. Négyféle hosszúságú DNS darabot amplifikáltam PCR segítségével a MXf1, MXf2, MXf3 és MXf4 forward, valamint a MXr reverse primerek segítségével (3. táblázat). A felhasznált primerek 5' végeire olyan restrikciós enzim felismerő helyeket terveztem, melyekkel a PCR terméket emésztve, azok egyszerűen ligálhatók a pPROBE-NT vektorba. A pPROBE-NT promóter próba vektor a zöld-fluoreszcens fehérje (GFP) egy módosított változatát tartalmazza, amely nagyobb intenzitással fluoreszkál, mint a vad típusú GFP. A pPROBE-NT vektort *Bam*HI és *Hind*III restrikciós enzimekkel emésztettem, és az ugyanígy emésztett PCR fragmenteket ligáltam a vektorba egyenként. A különböző hosszúságú PCR fragmenteket tartalmazó pPROBE-NT plazmidokat pMX1, pMX2, pMX3 és pMX4-nek neveztem el (16. ábra).



16. ábra. Az *mmoX* promóter régió klónozása. IHF(Intergration Host Factor kötőhely), RBS (Riboszóma kötőhely), σ^N (σ^N kötőhely), +1 (transzkripció start hely). A fekete nyilak jelölik az *mmoX* promóter régió különböző hosszúságú szakaszainak sokszorozásához használt primereket (MXf1, MXf2, MXf3, MXf4 és MXr). H (*Hind*III), B (*Bam*HI restrikciós enzim felismerő hely). T (transzkripció terminátor).

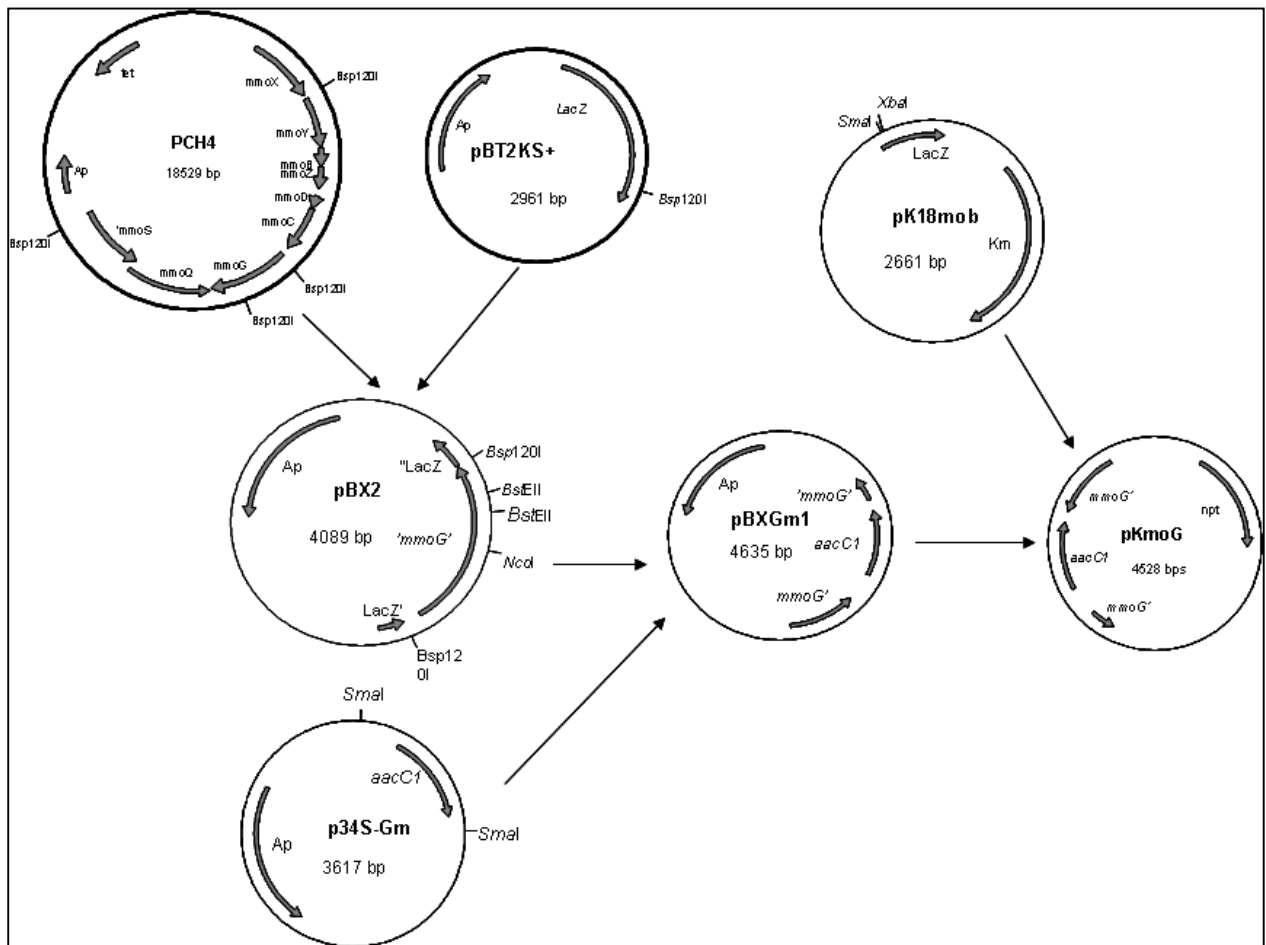
Az *mmoXYBZDCG* gén operonban valószínűsíthető promóter régiók vizsgálatához két promóter próba plazmidot készítettem: pPmoY-t és pPmoG-t (17. ábra). pPmoY elkészítéséhez a pCH4 plazmid 795 bp hosszúságú *Bam*HI-*Sph*I fragmentjét ligáltam a *Bam*HI-*Sph*I emésztett pPROBE-NT' promóter próba vektorba. Az *mmoC*-*mmoG* gének közti régiót PCR reakció

segítségével ampifikáltam a pCH4 plazmidot használva templátként, methrf és x2fw2 primerekkel (3. táblázat). A PCR reakcióban a Fermentas cég Pfu polimerázát használtam annak proof reading aktivitása miatt. A kapott 1077 bp-os terméket tisztítottam Microcon (Millipore) oszlop segítségével, és *Sma*I emésztett pPROBE-NT vektorba ligáltam. Az *mmoC-mmoG* intergenikus régiót megfelelő orientációban tartalmazó plazmidban az *mmoC-mmoG* régió megfelelő bázissorrendjét leellenőriztem szekvenálással. Az így elkészült plazmid kapta a pPmoG nevet (17. ábra).



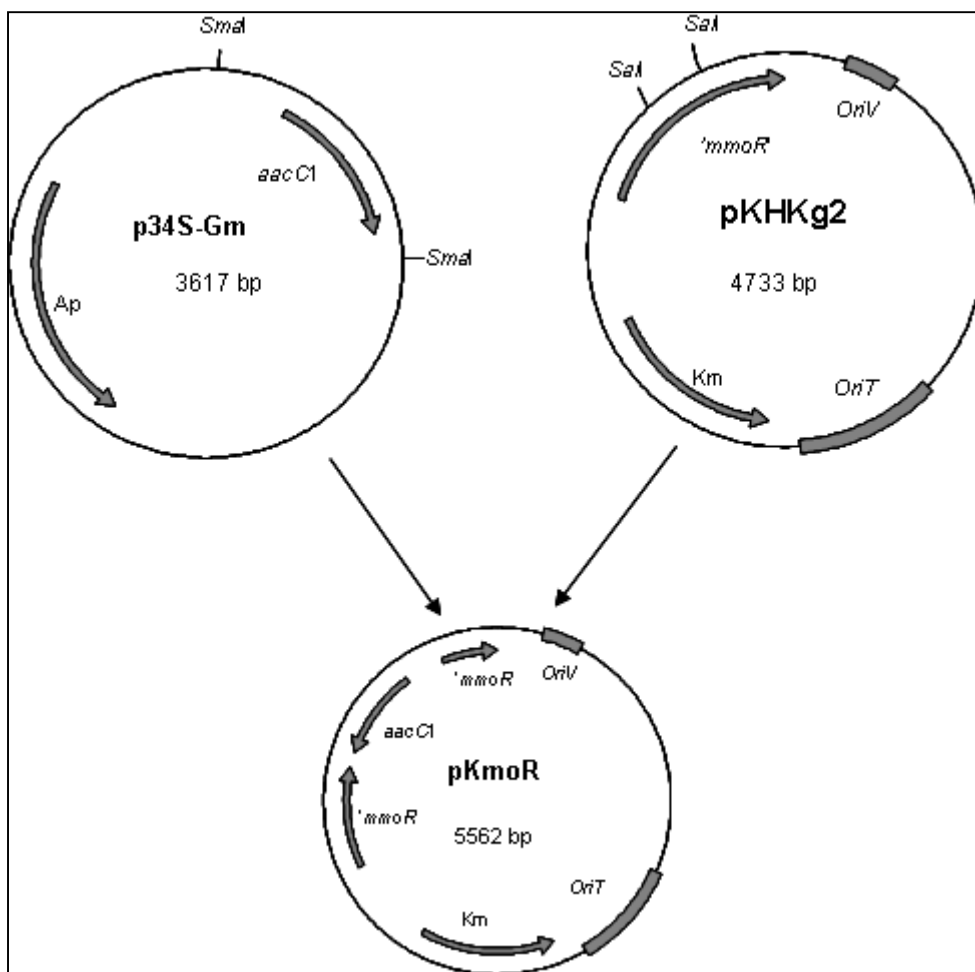
17. ábra. *mmoX-mmoY* és *mmoC-mmoG* intergenikus régiók klónozása promóter próba vektorba. pPmoY és pPmoG a megfelelő régiókat tartalmazó plazmidok neveit jelölik.

Az *mmoG* és *mmoR* gének markercserés mutagenéziséhez használt plazmidokat a következőképpen készítettem: A *Bsp*120I emésztett pCH4 plazmid 1128 bázispárnyi fragmentjét, mely tartalmazza az *mmoG* gén nagy részét, a *Bsp*120I emésztett pBluescript2SK+ vektorba ligáltam, létrehozva ezzel a pBX2 plazmidot. pBX2-t emésztettem *Nco*I és *Bst*EII enzimekkel. A létrejött 3755 bp-os fragmentet izoláltam, a lineáris DNS nem kompatibilis végeit Klenow(exo-) polimeráz segítségével feltöltöttem. A tompa végű 3755 bp-os fragmentet ligáltam a p34S-Gm plazmid (Dennis és Zylstra, 1998) *Sma*I emésztéssel kivágott 855 bp-os fragmentjével, ami tartalmazza a gentamicin rezisztenciát okozó *aacCI* gént. Az így létrejött plazmidot pBXGm1-nek neveztem el, az *aacCI* gén orientációját PCR segítségével ellenőriztem. A pBXGm1-et *Xba*I és *Pvu*II enzimekkel emésztettem. Az emésztés során létrejött 1844 bp-os DNS darabot, mely tartalmazta az *aacCI* gént az *mmoG* gén 5' illetve 3' régióit tartalmazó DNS szakaszokkal közrefogva (18. ábra) *Xba*I és *Sma*I emésztett pK18mobSacB (Schafer és mtsai., 1994) vektorba klónoztam, létrehozva ezzel a pKmoG nevű plazmidot.



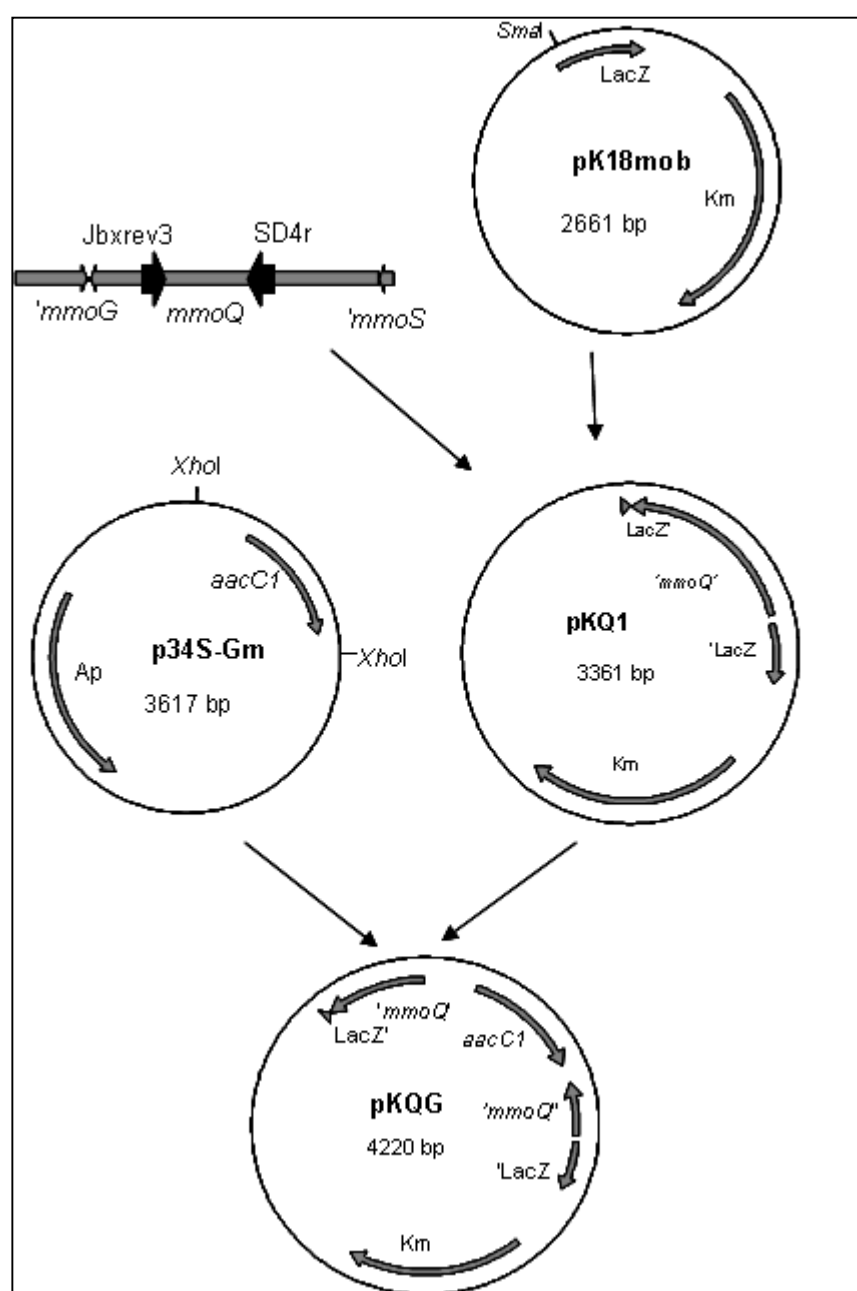
18. ábra. A pKmoG plazmid elkészítésének menete *mmoG* markercserés mutagenéziséhez.

Az *mmoR* gén markercserés mutagenéziséhez a pKmoR plazmidot készítettem el. pKHKg2 plazmidot emésztettem *Eco147I* és *SalI* enzimekkel, a létrejött ragadós végeket Klenow polimeráz segítségével feltöltöttem. Az emésztés során létrejött 4346 bp-os DNS darabot a p34S-Gm plazmidból *SmaI* emésztéssel izolált gentamicin rezisztencia gént tartalmazó DNS darabbal ligáltam (19. ábra).



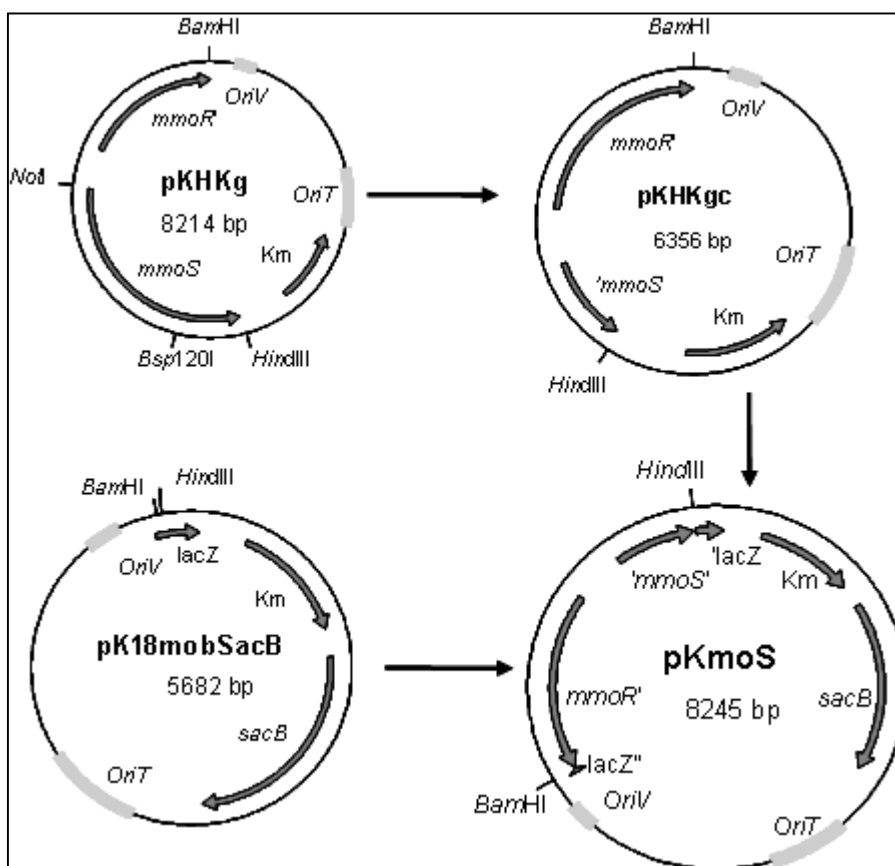
19. ábra. A pKmoR plazmid elkészítésének menete az *mmoR* markercserés mutagenéziséhez.

Az *mmoQ* és *mmoS* gének markercserés mutagenéziséhez a pKQG és pKSG plazmidokat a következőképp készítettem el: az *mmoQ* gén egy részét PCR segítségével sokszoroztam a jbxrev3 és SD4r primerek segítségével. A 699 bp hosszú PCR terméket tisztítottam és *SmaI* emésztett pK18mob vektorba ligáltam, létrehozva ezzel a pKQ1 konstrukciót. A p34S-Gm plazmidból a gentamicin rezisztencia gént tartalmazó 889 bp-os részt *XhoI* enzimmel vágtam ki. Ezt a DNS darabot gélből izoláltam, és *XhoI* emésztett pKQ1 plazmidba ligáltam. A gentamicin kazettát megfelelő orientációban tartalmazó plazmidot restrikciós enzim emésztésekkel ellenőriztem és pKQG-nek neveztem el (20. ábra).



20. ábra. A pKQG plazmid elkészítésének menete *mmoQ* markercserés mutagenéziséhez.

Az *mmoS* markeres inaktiválásához a pKHKg plazmidot *Bsp*120I és *Not*I enzimekkel hasítottam, létrehozva ezzel többek közt egy 8214 bp hosszúságú DNS szálát, amely tartalmazza az *mmoS* gén 5' és 3' darabját, valamint a teljes vektort (replikációs origó, kanamicin rezisztencia gén). Ezt a fragmentet gélből izoláltam, ragados végeit Klenow polimeráz segítségével tompa végűvé alakítottam, majd önmagára ligáltam, létrehozva ezzel a pKHKgc plazmidot. A pKHKgc plazmidot *Bam*HI és *Hind*III enzimekkel emésztettem, a 2593 bp hosszúságú fragmentet *Bam*HI és *Hind*III enzimekkel emésztett pK18mobSacB vektorba ligáltam, létrehozva ezzel pKmoS plazmidot (21. ábra).



21. ábra. A pKmoS plazmid elkészítésének menete *mmoS* deléciós mutagenéziséhez.

3.14. *Transzpozonos mutagenézis*

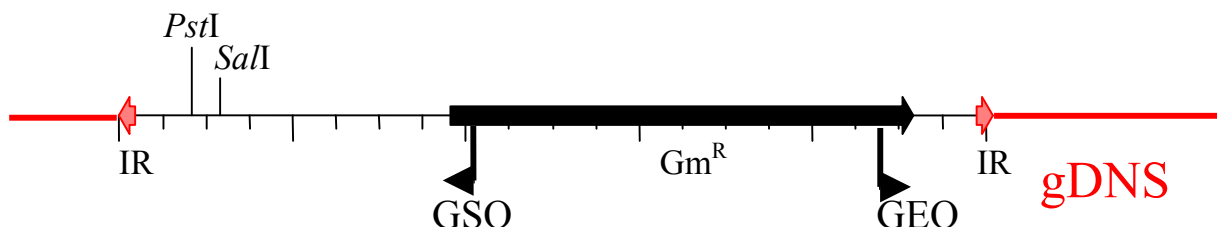
A 3. táblázatban szereplő mini-transzpozonokat *E. coli* S17-1 λpir vagy *E. coli* SM10 λpir donor törzsekbe transzformáltam, majd konjugációval *M. capsulatus* (Bath) törzsbe jutattam a fentebb leírt módszer szerint. Párhuzamosan elvégeztem a konjugáció kontrollját a donor törzsek nélkül is. Konjugációt követően NMS lemezekre szélesztettem a transzkonjugánsokat. A donor törzs nélküli *M. capsulatus* (Bath) sejtszuspenziót antibiotikum tartalmú táplemezre szélesztettem, meghatározva ezzel a spontán rezisztens kolóniák számát (SR). A donor törzset is tartalmazó sejteket antibiotikum tartalmú táptalajra szélesztve meghatározható a spontán rezisztensek és a transzkonjugánsok száma (SRTC). A sejtkeveréket antibiotikum mentes táptalajra szélesztve megkaptam a *M. capsulatus* (Bath) sejtek teljes kolónia képző számát (CFU). A transzpozonos mutánsok gyakoriságát (FR) a következő képlettel számoltam ki: $FR = (CFU / (SRTC - SR))$.

7-10 mutánst véletlenszerűen kiválasztottam, majd Southern hibridizációval megvizsgáltam, hogy a mini-transzpozon véletlenszerűen és egy példányban épült-e be az egyes mutánsok genomjába. A mutánsokból genomi DNS-t izoláltam és megemésztettem *Pst*I enzimmal, majd egyforma mennyiségben 1%-os agaróz gélen elválasztottam a DNS darabokat, ezután a genomi DNS mintákat Southern blott technikával nylon membránra vittem át. A membránt a mini-transzpozon antibiotikum rezisztencia génjének megfelelő DIG-dUTP (Roche) jelölt próbával hibridizáltam a cég ajánlása szerint, majd kemilumineszens szubsztráttal detektáltam.

3.14.1. *Mini-transzpozon integrációs helyének azonosítása*

sMMO mutánsokból genomi DNS-t izoláltam és olyan restriktációs enzimmal emésztettem, amely a mini-transzpozon MCS régiójában található (22. ábra). Az emésztett genomi DNS-t Microcon-PCR (Millipore) oszlopon tisztítottam, a restriktációs enzim és a sók eltávolítása céljából. Hőérzékeny enzimek esetén a tisztítás előtt 80°C-on 20 percig inkubáltam az enzim inaktiválása érdekében. A tisztított és emésztett genomi DNS-t ligáz reakcióban cirkularizáltam. A ligálási reakciót ismét tisztítottam, majd 1-10 µl-ét PCR reakcióban templátként használtam. A PCR reakcióban a GEO és GSO primerpár segítségével PCR reakcióban sokszoroztam a transzpozont határoló genomi régiót. A PCR termékeket tisztítottam, és a DNS bázissorrendjét az MTA Szegedi Biológiai Központ szekvenáló laborjában meghatároztattam a GEO és GSO primerek segítségével (22. ábra). A meghatározott

bázissorrendben azonosítottam a mini-transzpozonra jellemző nukleotid-sorrendet, a fennmaradó genomi szakasz nukleotid-szekvenciáját a *M. capsulatus* (Bath) genomjában azonosítottam a BLASTn program segítségével.



22. ábra. A mini-transzpozon genomba integrálódott mobilis elemének sematikus rajza.
IR (fordított ismétlődő szekvencia).

3. táblázat A felhasznált törzsek, plazmidok és primerek.

Törzsek /Plazmidok /Primerek	Jellemzők	Referenciák
Törzsek		
<i>Methylococcus capsulatus</i> (Bath)		Whittenbury és mtsai., (1970)
<i>Escherichia coli</i> S17-1 λpir	<i>recA thi pro hsdR</i> RP4-2-Tc::Mu Km::Tn7 λpir	Herrero, Delorenzo, és Timmis, (1990)
<i>Escherichia coli</i> DH5α	<i>recA1 endA1 GyrA96 thi-1 relA1 hsdR17</i> (<i>supE44</i> <i>σlacU169</i>) (Φ80 <i>lacZ</i> <i>σM15</i>)	Hanahan, (1983)
Plazmidok		
pBluescript2SK+	Ap ^R , általános klónozó vektor	Stratagene
pK18mob	Km ^r , RP4mob, mobilizálható klónozó vektor	Schafer és mtsai. (1994)
pK18mobsac	Km ^r , RP4mob, mobilizálható klónozó vektor, a SacB génnel pozitív szelekcióhoz	Schafer és mtsai. (1994)
p34S-Gm	Ap ^R , Gm ^R , Gm rezisztencia kazetta	Dennis és Zylstra, (1998)
pPROBE-NT	Km ^R , promóter próba vektor EGFP variánssal	Miller és mtsai. (2000)
pBBR1MCS-4	Ap ^R , széles gazdaspecifitűsű klónozó vektor	Kovach és mtsai., (1995)
pCH4	pBR325 a 12,5 kb <i>EcoRI smmo</i> inszerttel	Stainthorpe és mtsai., (1989)
pLOF mini Tn10 Km	Alacsony kópiaszámú mini-Tn10 hordozó vektor Ap ^R , Km ^R	Delorenzo és mtsai., (1990)
pUT Tn5 Km	Alacsony kópiaszámú mini-Tn5 hordozó vektor Ap ^R , Km ^R	Delorenzo és mtsai., (1990)
pTnMod-OGm	Magas kópiaszámú mini-Tn5 hordozó vektor Ap ^R , Gm ^R	Dennis és Zylstra, (1998)
pTnMod-SmO	Magas kópiaszámú mini-Tn5 hordozó vektor Ap ^R , Sm ^R	Dennis és Zylstra, (1998)
pTnMod-OKm	Magas kópiaszámú mini-Tn5 hordozó vektor Ap ^R , Km ^R	Dennis és Zylstra, (1998)
pTnMod-OGm	Magas kópiaszámú mini-Tn5 hordozó vektor Ap ^R , Gm ^R	Dennis és Zylstra, (1998)
pTNG	promóter próba transzpozon (<i>gfp</i>) Km ^R , Gm ^R	Tang, Lu, és Pan, (1999)
pAG408	promóter próba transzpozon (<i>gfp-aacC3</i>) Km ^R	Suarez és mtsai., (1997)
pBSL202	mini-Tn5 transzpozon Ap ^R , Gm ^R	Alexeyev és mtsai., (1995)

pBSL118	mini-Tn5 transzpozon Ap ^R , Km ^R	Alexeyev és mtsai., (1995)
pBX2	pBluescript2SK+ az 1,1 kb <i>Bsp</i> 120I <i>smmo</i> inszerttel	Jelen munka
pMCS441	pBBR1MCS-4 a 4,2 kb <i>Bsp</i> 120I <i>smmo</i> inszerttel	Jelen munka
pKPS	pK18mob az 1,0 kb <i>Eco</i> RI- <i>Bgl</i> II <i>smmo</i> inszerttel	Jelen munka
pKPSg	pK18mob a 27,5 kb <i>Hind</i> III <i>smmo</i> inszerttel	Jelen munka
pKHK	pK18mob a 0,7 kb <i>smmo</i> inszerttel	Jelen munka
pKHKg	pK18mob a 4,7 kb <i>smmo</i> inszerttel	Jelen munka
pKHKg2	pK18mob az 1,0 kb <i>smmo</i> inszerttel	Jelen munka
pKHKg4	pK18mob a 2,3 kb <i>smmo</i> inszerttel	Jelen munka
pKHKg6	pK18mob az 1,4 kb <i>smmo</i> inszerttel	Jelen munka
pMX1	pPROBE-NT a 475 bp <i>Hind</i> III- <i>Bam</i> HI <i>mmoX</i> promóter régióval	Jelen munka
pMX2	pPROBE-NT a 335 bp <i>Hind</i> III- <i>Bam</i> HI <i>mmoX</i> promóter régióval	Jelen munka
pMX3	pPROBE-NT a 258 bp <i>Hind</i> III- <i>Bam</i> HI <i>mmoX</i> promóter régióval	Jelen munka
pMX4	pPROBE-NT a 165 bp <i>Hind</i> III- <i>Bam</i> HI <i>mmoX</i> promóter régióval	Jelen munka
pKmoG	pK18mob a 1,9 kb <i>mmoG::aacC3</i> inszerttel	Jelen munka
pKmoR	pK18mob a 1,5 kb <i>mmoR::aacC3</i> inszerttel	Jelen munka
pKQG	pK18mob a 1,6 kb <i>mmoR::aacC3</i> inszerttel	Jelen munka
PkmoS	pK18mob <i>mmoS</i> 5' régiót tartalmazó plazmid	Jelen munka
Primerrek		
MXr	CAGGATCCATGATGAATGCCCGATGA	<i>mmoX</i> promóter régió
MXf1	CTAAGCTTCTGCCGCGAGTTCGTCGC	<i>mmoX</i> promóter régió
MXf2	CTAAGCTTTCCGCGCAGCCCCGATTC	<i>mmoX</i> promóter régió
MXf3	CTAAGCTTGAGTTATGGCGGCCAGTA	<i>mmoX</i> promóter régió
MXf4	CTAAGCTTCGGAGCATTCGGATAACG	<i>mmoX</i> promóter régió
pmoRf	AGTGGAAGTGC GCGATTTCGG	<i>mmoR</i>
pmoRr	CTGGATTGCGGCGCAGTCTA	<i>mmoR</i>
mxatgrev	TTCTTCTGTTCGCCGCCCT	<i>mmoX</i>
mxatgfw	ATGGCACTTCGCACCGCAACC	<i>mmoX</i>
HKfw	GTGGGTCAGATAATAGGCTCAG	<i>mmoS</i>
Hkrev	ATCCGCCAGATACTCACCAC	<i>mmoS</i>
JBXfw1	CACATGCCGTACATGGAC	Szekvenáló primer
JBXfw2	CACCAACCGTGTCATCCT	Szekvenáló primer
JBXfw3	AGGTGATCGTCGCCATGCT	Szekvenáló primer
JBXfw42	CACTCCTGGCAGAAATG	Szekvenáló primer
JBXfw5	GGTGAACATGCATAAG	Szekvenáló primer
JBXrev2	CGGAAGTTTCTGCGACCT	Szekvenáló primer
JBXrev3	CAGTCGAGGTCGAGCATCAT	Szekvenáló primer
JBXrev4	CATGTGCCAGTCCGTGAT	Szekvenáló primer
JBXrev5	GATCGGTGGCAAAGCGTTCC	Szekvenáló primer
JBXrev6	ATTGGAGCGCGTCGATGAA	Szekvenáló primer
MCthrfw	CCGGCGAACAGGTCTTCTT	Szekvenáló primer
X2thrfw	TGTCCACGAGAAGGCACTG	Szekvenáló primer
X2fw2	GATCGGTCATCAAGAGGT	Szekvenáló primer
X2rev2	AGGACCGTGTCGCAATCTC	Szekvenáló primer
SD1r	GTA CTGCTCCGCTTCCA	Szekvenáló primer
SD2r	AAGGACCTGCTGCTGAA	Szekvenáló primer
SD3r	CGCTACTCGTCGGAAC	Szekvenáló primer
SD4r	CTCGTTTGCTCGCAGAC	Szekvenáló primer
SD5r	GCACTCCAATCGATCAC	Szekvenáló primer
SD2r	AAGGACCTGCTGCTGAA	Szekvenáló primer
SD3r	CGCTACTCGTCGGAAC	Szekvenáló primer
SD4r	CTCGTTTGCTCGCAGAC	Szekvenáló primer
Primer nukleotid-sorrendje		
	CAGGATCCATGATGAATGCCCGATGA	<i>mmoX</i> promóter régió
	CTAAGCTTCTGCCGCGAGTTCGTCGC	<i>mmoX</i> promóter régió
	CTAAGCTTTCCGCGCAGCCCCGATTC	<i>mmoX</i> promóter régió
	CTAAGCTTGAGTTATGGCGGCCAGTA	<i>mmoX</i> promóter régió
	CTAAGCTTCGGAGCATTCGGATAACG	<i>mmoX</i> promóter régió
	AGTGGAAGTGC GCGATTTCGG	<i>mmoR</i>
	CTGGATTGCGGCGCAGTCTA	<i>mmoR</i>
	TTCTTCTGTTCGCCGCCCT	<i>mmoX</i>
	ATGGCACTTCGCACCGCAACC	<i>mmoX</i>
	GTGGGTCAGATAATAGGCTCAG	<i>mmoS</i>
	ATCCGCCAGATACTCACCAC	<i>mmoS</i>
	CACATGCCGTACATGGAC	Szekvenáló primer
	CACCAACCGTGTCATCCT	Szekvenáló primer
	AGGTGATCGTCGCCATGCT	Szekvenáló primer
	CACTCCTGGCAGAAATG	Szekvenáló primer
	GGTGAACATGCATAAG	Szekvenáló primer
	CGGAAGTTTCTGCGACCT	Szekvenáló primer
	CAGTCGAGGTCGAGCATCAT	Szekvenáló primer
	CATGTGCCAGTCCGTGAT	Szekvenáló primer
	GATCGGTGGCAAAGCGTTCC	Szekvenáló primer
	ATTGGAGCGCGTCGATGAA	Szekvenáló primer
	CCGGCGAACAGGTCTTCTT	Szekvenáló primer
	TGTCCACGAGAAGGCACTG	Szekvenáló primer
	GATCGGTCATCAAGAGGT	Szekvenáló primer
	AGGACCGTGTCGCAATCTC	Szekvenáló primer
	GTA CTGCTCCGCTTCCA	Szekvenáló primer
	AAGGACCTGCTGCTGAA	Szekvenáló primer
	CGCTACTCGTCGGAAC	Szekvenáló primer
	CTCGTTTGCTCGCAGAC	Szekvenáló primer
	GCACTCCAATCGATCAC	Szekvenáló primer
	AAGGACCTGCTGCTGAA	Szekvenáló primer
	CGCTACTCGTCGGAAC	Szekvenáló primer
	CTCGTTTGCTCGCAGAC	Szekvenáló primer

SD23r	ACCAGGCGTTCGTCCAT	Szekvenáló primer
SD34r	GCTGGAAGTGTGCAGAG	Szekvenáló primer
Sd45r	ATGCTGCTGACGGACTG	Szekvenáló primer
SD55f	CCAACAGACCCAGTGTG	Szekvenáló primer
SD6f	GGCTTGCTGAGATAGTC	Szekvenáló primer
SD7f	CCCGGTTCTGCATTCAT	Szekvenáló primer

Eredmények és tárgyalásuk

4.1. *mmoX* promóter régiójának elemzése

Nielsen (Nielsen és *mtsai.*, 1996) korábbi munkáiban leírta, hogy a *M. capsulatus* (Bath) törzsben az *smmo* gének transzkripciója egy, az *mmoX*-től 5' irányban elhelyezkedő transzkripciós start helytől kezdődik. Az *mmoX* promóter régiójában mind a σ^{70} mind a σ^N kötőhelyeket azonosított, munkája során ezek közül a σ^{70} típusú promóter működését valószínűsítette az *smmo* gének transzkripciójában.

Az *mmoX* promóter régióját számítógéppel segített szekvencia analízissel alaposabban is megvizsgáltam. 5' irányban 12 bázispárnyi távolságban a transzkripciós start helyhez viszonyítva egy tipikus σ^N felismerőhely (Barrios és *mtsai.*, 1999) található: TGGCAC-N₆-TGCNNt (17. ábra). A σ^N felismerő helytől távolabb 5' irányban egy ún. Intergration-Host-Factor (IHF) kötőhely található: WATCAA-N₄-TTR, ami igen jellemző a σ^N típusú promóterekre (Colladovides és *mtsai.*, 1991). Az IHF két fehérjéjét kódoló géneket sikerült megtalálni a *M. capsulatus* (Bath) akkor még be nem fejezett genom szekvenciájában (<http://www.tigr.org>). A *M. capsulatus* (Bath) IHF-et kódoló génjei 77% azonosságot mutatnak aminosav szinten az *E. coli* ugyanezen génjeivel, tehát kézenfekvő a feltételezés, hogy *M. capsulatus* (Bath) is rendelkezik IHF fehérjével, ami a σ^N típusú promóterek működéséhez szükséges. A σ^N típusú promóterek szintén általános jellemzője, egy távoli ún. „Upstream Activator Sequence” (UAS), mely egy meghatározott DNS szakasz és IHF kötőhelytől akár több 100 bázispárnnyira 5' irányban helyezkedik el. Ehhez a UAS régióhoz köt egy fehérje, melyet általánosságban σ^N függő aktivátor fehérjének neveznek, amely adott körülmények közt aktív vagy inaktív konformációt vehet fel elindítva vagy leállítva ezzel a σ^N promóterről történő transzkripciót (Colladovides és *mtsai.*, 1991).

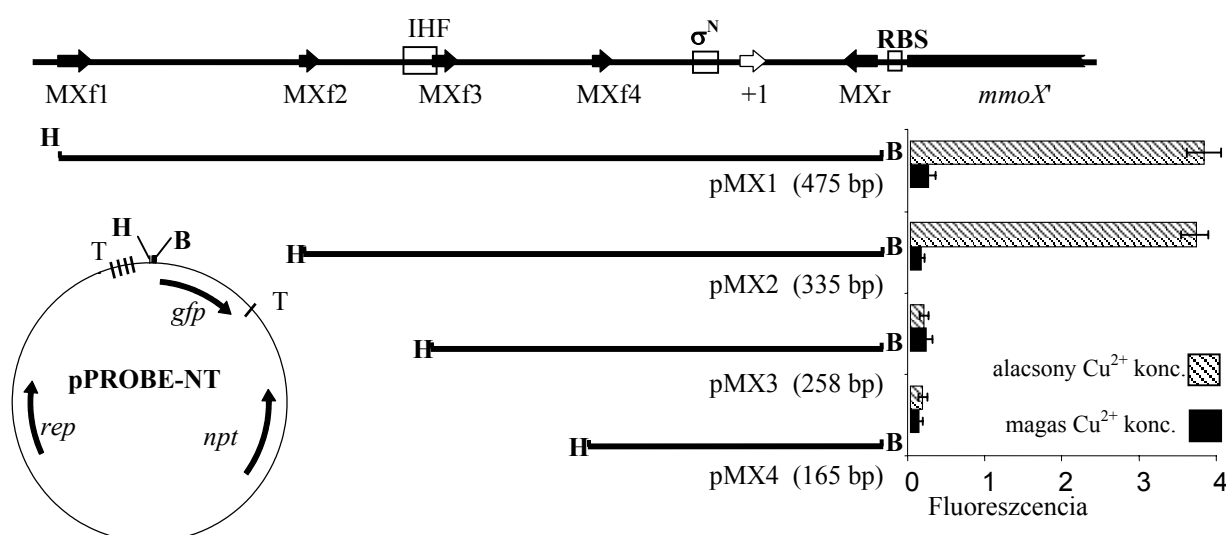
MXf1
 ATCTGCCGCGAGTTCGTCGCGCGACAGGTTTCCGGCGCCGCGAATCGTGCCTCTATGACATA
 TTTGGGCATGGTTATCAGCCTTACGGTTCTGGTAAGGAAAAATAGGCTTGTATTGTGCTTA
MXf2
 TCCGAAGATAAGCGCTTCCGCGCAGCCCGATTCTTTCATGGATCACGATTCCATTGAATGC
 IHF **MXf3**
 GCGCAAATGTCTCAGGGTCCGGTCATG **AATGAAGAGTTA** TGGCGGCCAGTACGTCACCGTT
 ATGTCCGATGGCTGTATCAAACAAAGACAGTGTAGTGATATCGGACAACTCGTCCATCCCC
MXf4
 GTCGGAGCATTCGGATAACGTGTCATCGTTCCAAATATTGATATATCGGTATACGTATCCG
 σ^N -24 σ^N -12 +1->
 AAGAATAAAGT **TGGCACGATCCCTGTA** ACTAGGTTGTCACGACCTCGTCGGAGGTTGTATGT
 MXr RBS M
 CCGGTGTTCCGTGACGTCATCGGGCATTTCATTCATAGAATGTGTTACG **GAGGA** AACAAGTAATG

24. ábra. Az *mmoX* gén promóter régiójának bázissorrendje és a promóterre jellemző DNS motívumok. MXf1, Mxf2, Mxf3, Mxf4 és Mxr a promóter régió felsokszorozásához használt primereket jelölik.

Mivel *M. capsulatus* (Bath)-ban ez idáig nem írtak le megbízható riporter gént, a szükséges promóter próba konstrukciók elkészítéséhez előbb találni kellett egy, a *M. capsulatus* (Bath)-ban is megfelelően működő riporter gént. A Green Fluorescent Protein (GFP) mint riporter gén számos organizmusban alkalmazható (Southward és Surette, 2002). Csak oxigén és kalcium ionok szükségesek az aktivitásához. A pPROBE-NT vektor tökéletesen megfelelt az elvárásaimnak: a plazmid replikálódik *M. capsulatus* (Bath)-ban, megfelelő antibiotikum rezisztencia gént tartalmaz, alacsony kópia számú, megfelelő restrikciós enzim felismerő helyek segítik a promóter klónozását, kis méretű és a *gfp* gén megfelelő variánsát tartalmazza (EGFP) (Haseloff, 1999). Az *mmoX* promóter régiójának különböző hosszúságú szakaszait amplifikáltam PCR segítségével és klónoztam a pPROBE-NT transzkripció fúziós vektorba a módszereknél leírtak szerint (16. ábra). A különböző hosszúságú *mmoX* promóter darabokat tartalmazó riporter konstrukciókat *M. capsulatus* (Bath)-ba vittem be konjugációval. A réz-ionok jelenlétében illetve réz-ion mentes tápoldatban növesztve *M. capsulatus* (Bath) szuszpenziók GFP aktivitását hasonlítottam össze (25. ábra).

Az *mmoX* 5' régiójában található DNS-szakaszon *in silico* analízissel azonosítottam a σ^N típusú promóterekre jellemző -12 és -24-es DNS motívumokat, valamint egy IHF kötőhelyet a -24-es motívumtól 5' irányban. Az eredmények tisztán jelzik, hogy az *mmoX* ATG kodonjához viszonyítva -358 és -280 bázispárok közé eső régió elengedhetetlenül szükséges az *mmoX*

promóter rézfüggő működéséhez. A tények alapján, miszerint egy IHF kötőhely található *mmoX* promóter régiójában és az IHF génjei is megtalálhatóak a *M. capsulatus* (Bath) genomjában feltételeztem, hogy sMMO génjeinek transzkripciója nem egy σ^{70} típusú promóterről indul, amint azt Nielsen és munkatársai feltételezték, hanem egy tipikus σ^N típusú promóterről. A *M. trichosporium* OB3b törzsben szintén kimutatták (Stafford és mtsai., 2003), hogy az *mmoX* transzkripciója σ^N -függő, ebben a törzsben sikerült az *rpoN* gént mutagenizálni és a mutáns törzsben rézmentes körülmények között sem expresszáldott sMMO. *M. capsulatus* (Bath) törzs genomjában is azonosítható az *rpoN* gén, de nem sikerült $\Delta rpoN$ mutánsokat előállítani irányított mutagenézissel.



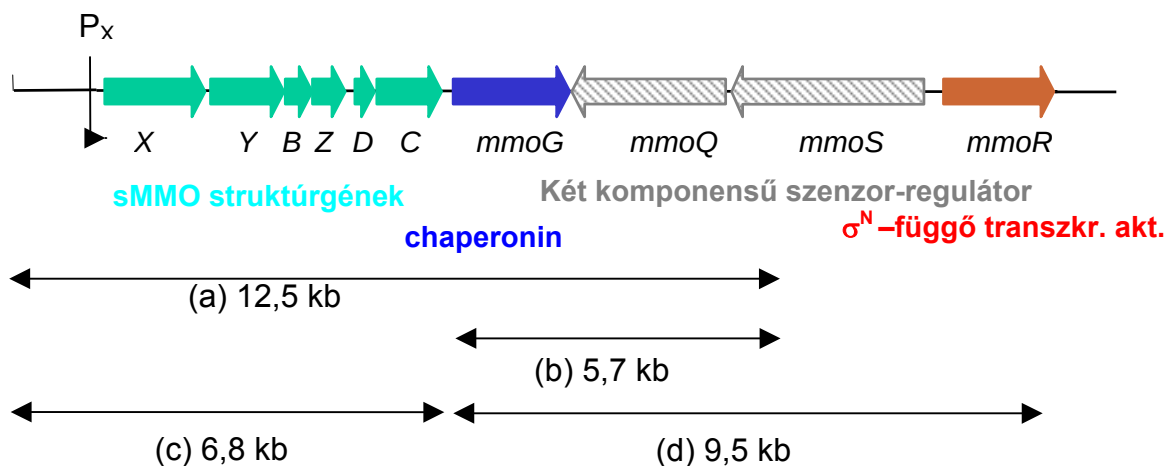
25. ábra. Az *mmoX* promóter régió promóter aktivitása.

IHF(intergration Host Factor kötőhely), RBS (Riboszóma kötőhely), σ^N (σ^N kötőhely), +1 (transzkripció start hely). A fekete nyilak jelölik az *mmoX* promóter régió különböző hosszúságú szakaszainak felszorzozásához használt primereket (Mxf1, MXf2, Mxf3, Mxf4 és Mxr). H (*Hind*III), B (*Bam*HI restrikciós enzim felismerő hely). T (transzkripció terminátor).

4.2. Az *sMMO* struktúrgénektől 3' irányban elhelyezkedő DNS régió vizsgálata

A laborunkban korábban végzett kísérletek alapján valószínűsíthető volt, hogy a pCH4 plazmid a már ismert *smmo* géneken kívül tartalmaz olyan géneket is, amelyek a réz szabályozott sMMO kifejeződésért felelősek. A pCH4 plazmid 12,5 kb hosszúságú DNS szakaszát (26. ábra a) a pVK100, széles gazdaspecifitású, vektorba klónozták (pVK104). Ez a 12,5 kb-os szakasz tartalmazza az *mmoXYBZDC* géneket és az *mmoC*-től 3' irányban elhelyezkedő 5,7 kb ismeretlen nukleotidszekvenciájú DNS szakaszt (26. ábra b). A pVK104 plazmidot olyan metanotróf törzsbe vitték be, amely természetes körülmények közt nem tartalmaz sMMO-t (*Methylocaldum szegediense* OR2). Ez a törzs a pVK104 plazmiddal rézmentes körülmények közt gyengén expresszált sMMO-t, míg magas réz ion koncentráció esetén nem.

A már korábban megismert *mmoXYBZDC* génektől 3' irányban elhelyezkedő körülbelül 9,5 kb hosszúságú DNS szakasz bázissorrendjét határoztam meg (15. ábra, 26. ábra d). Ezen 9,5 kb-os régió 5,7 kb hosszúságú részét már korábban klónozták a pCH4 plazmidon az *smmo* génekkel együtt, de pontos bázissorrendjét nem határozták meg (26. ábra) (Stainthorpe és mtsai., 1989).



26. ábra. Az *smmo* struktúrgének és a jelen munka során megismert, szabályozásban résztvevő gének.

- (a) a pCH4 és pVK104 plazmidokban lévő DNS szakasz;
- (b) a pCH4 és pVK104 plazmidokban lévő jelen munka során megszekvenált DNS szakasz ;
- (c) pCH4 és pVK104 plazmidokban lévő korábban már ismert DNS szakasz;
- (d) jelen munka során megismert bázissorrendű DNS szakasz.

Az *mmoC* géntől 3' irányban azzal megegyező orientációban egy a *groEL* génhez hasonló nyitott leolvasási keretet (ORF) találtam, amit *mmoG*-nek neveztem el (Methane-MonoOxygenase-associated-GroEL). *mmoG* mellett egy újabb ORF-et azonosítottam az *mmoG*-

vel ellentétes orientációban. Ennek az ORF-nek (*mmoQ*) a feltételezett génterméke aminosav sorrend szinten nagyon hasonlít az ún. két-komponensű szenzor-regulátor rendszerek regulátor tagjára. Közvetlen az *mmoQ* mellett található DNS szakaszból (*mmoS*) lefordított polipeptid nagyfokú azonosságot mutat a két-komponensű szenzor-regulátor rendszerek szenzor tagjával. Az *mmoS* teljes kódoló DNS szakaszát a *M. capsulatus* (Bath) genomból klónoztam meg, a módszereknél leírtak szerint. Az *mmoS* klónozásakor izolált DNS szakaszon nemcsak az *mmoS* hiányzó 3' régióját találtam meg, hanem egy újabb nyitott leolvasási keretet az *mmoS*-sel ellentétes orientációban. Ez a feltételezett gén egy σ^N függő transzkripció aktivátort kódol, amit *mmoR*-nek neveztem el (26. ábra).

4.3. Az új nyitott leolvasási keretek szekvencia analízise

4.3.1. MMOG, a feltételezett chaperonin

Az *mmoG* egy 559 aminosav hosszúságú feltételezett fehérjét kódol, melynek a számított molekulatömege 59,5 kDa. A feltételezett MMOG 39%-ban azonos és 60%-ban hasonló a cpn60 típusú chaperoninok nagy alegységével (GroEL) ((Ranson és mtsai., 1998)). A GroEL a legtöbb mikroorganizmusban megtalálható hősokk fehérje, mely nagyon hasonló génszerveződést mutat minden fajban. A *groEL* géntől 5' irányban szinte mindig megtalálható a hősokk fehérje kis alegységét kódoló gén: *groES* ((Ranson és mtsai., 1998)). Jelen esetben azonban az *mmoG* környezetében sehol nem található GroES-hez hasonló fehérjét kódoló szakasz. Az *mmoG*-hez nagyon hasonló gén megtalálható *M. trichosporium* OB3b törzsben is, annak sMMO struktúrgénjeinek szomszédságában (Stafford és mtsai., 2003) (30. ábra). A *M. trichosporium* OB3b MMOG feltételezett fehérjéje *M. capsulatus* (Bath)-ban meglévő párja 41%-ban azonos és 59%-ban hasonló aminosavakat tartalmaz. Tipikus Shine-Dalgrano szekvencia található *mmoG* start kodonjától 10 bázispárnyira 5' irányban: CGGAG. A σ^{70} vagy σ^N típusú promóterekre jellemző kötőhelyeket nem találtam az *mmoC* és *mmoG* nyitott leolvasási keretek közt lévő 351 bázispárnyi DNS szakaszon. A *groESL* hősokk operonok karakterisztikus komponense az ún.: CIRCE (controlling inverted repeat of chaperon expression) motívum (TTAGCACTC-N₉-GAGTGCAA) sem található meg az említett régióban, habár a *M. capsulatus* (Bath) genomjában meglévő két szinte azonos *groESL* operonok promóterében jól azonosítható ez a motívum. A CIRCE motívum hiánya és a σ^{70} és σ^{54} promóterek jellemző DNS motívumok hiánya arra utal, hogy MMOG nem a GroESL chaperoninoknak megfelelő, hősokk funkciójú fehérje. Az *mmoC*

és *mmoG* közti régióba p-független transzkripció terminációs szignál sem azonosítható, míg *mmoG* stop kodonjától 90 bázispárra 3' irányban található egy nagy energiájú (-20,2 kcal=84,5 kJ) ún. hajtúkanyar (stem-loop) struktúra kialakítására képes DNS szakasz, ami p-független transzkripció terminációs szignálként funkcionálhat. Az itt felsorolt megállapítások alapján feltételezhető, hogy *mmoC* és *mmoG* együtt íródik át és így az MMOG fontos szerepet játszhat az sMMO érésében, összeszerelődésében.

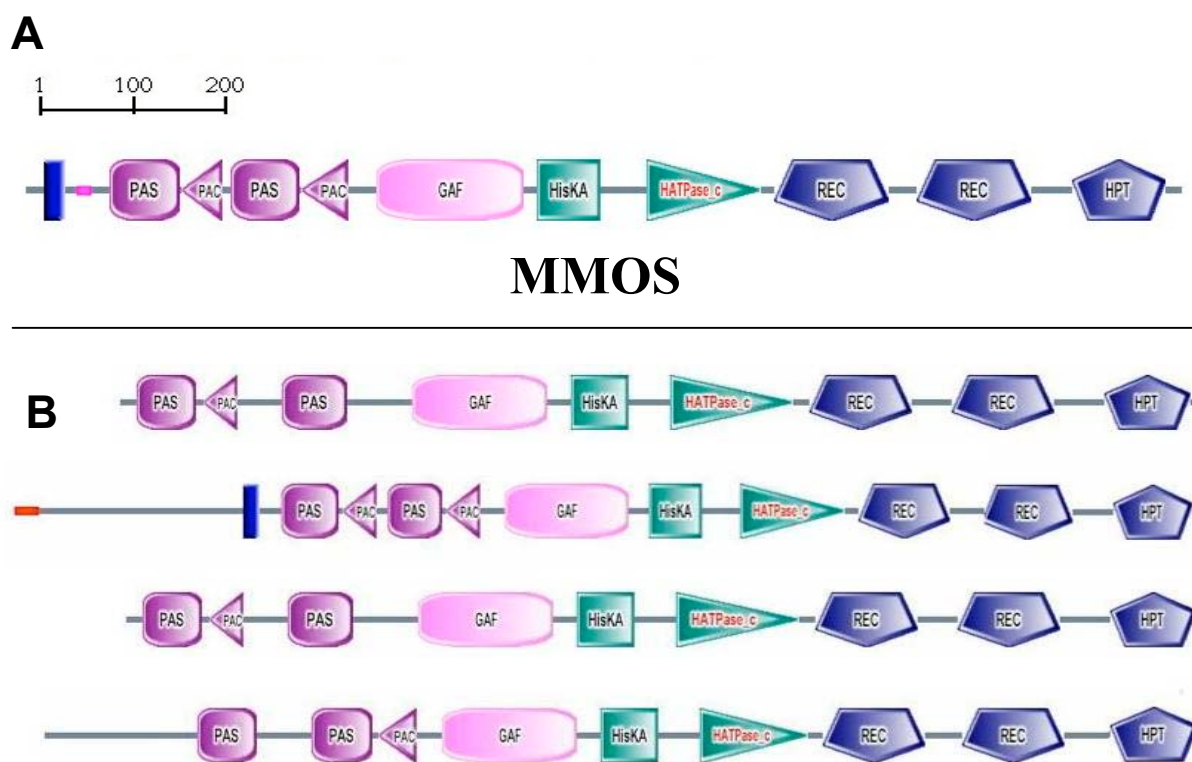
4.3.2. Az MMOS-MMOQ, a feltételezett két-komponensű jelátvivő rendszer

A szenzor-regulátor rendszer génjei, az *mmoS* és az *mmoQ* az *mmoG*-vel ellentétes irányban íródnak át. Egy σ^{70} típusú promóter motívumait azonosítottam a *mmoS* feltételezett riboszóma-kötőhelyétől 5' irányban. Az *mmoS* feltételezett génterméke egy 1177 aminosav hosszúságú 128,6 kDa molekulatömegű polipeptid. A feltételezett regulátor protein (MMOQ) 634 aminosav hosszú és 69,8 kDa tömegű. A *M. trichosporium* Ob3B és más metanotróf törzsekben sem sikerült eddig azonosítani MMOS és MMOQ fehérjéket.

Az *mmoQ* start kodonja átfed *mmoS* stop kodonjával, ami alapján szinte biztos, hogy egy mRNS-en helyezkednek el. Ez a génelrendezés nagyon jellemző a két-komponensű jelátviteli rendszerek génjeire. A feltételezett MMOS-MMOQ fehérjék is nagy (50%) hasonlóságot mutatnak más két-komponensű jelátviteli rendszerek géntermékeivel. Ezekben a rendszerekben a környezeti jelet a szenzor (MMOS) fehérje érzékeli és továbbítja a regulátor fehérjére transzfoszforiláció útján. A szenzor fehérje N-terminális részén két ún. PAS-PAC domént (Galperin és *mtsai.*, 2001) lehet azonosítani, mely domének legtöbbször a környezet redox állapotát érzékelő szenzor fehérjékben találhatók meg (Green és Paget, 2004). A szenzor fehérjék, mivel legtöbbször a sejt környezetében bekövetkező változásokat érzékelik, a sejt membránjához kapcsolódnak, integráns membránfehérjék egy külső érzékelő résszel, és egy sejtben belüli jelátvivő résszel. A feltételezett MMOS számított membrántopológiája egy transzmembrán régiót jelez a 19-41 aminosavak közti szakaszon. Mivel a fehérje érzékelő doménjei a 41. aminosav után helyezkednek el, illetve az első 19 aminosav nem tartalmaz semmiféle tipikus fehérje motívumot, nagyon valószínű, hogy felépítése hasonló a többi redox állapotot érzékelő szenzor molekulához (Malpica és *mtsai.*, 2004); MMOS-t a sejtmembránba horgonyozza az N-terminálison lévő hidrofób domén. A PAS-PAC domének mellett még egy GAF domén (Aravind és Ponting, 1997, Galperin és *mtsai.*, 2001) is megtalálható a feltételezett

MMOS szenzor részében. A GAF domén azon két-komponensű rendszerek szenzor fehérjéire jellemző, amelyek valamilyen kis molekulát kötnek meg pl. c-di-GMP-t (D'Argenio és Miller, 2004). A két típusú szenzor domén megjelenése egyazon szenzor molekulában ritka jelenség. A fent említett érzékelő funkciójú domének mellett sehol nem találtam a tipikus réz-ion kötő MxCxxC motívumot a feltételezett MMOS szenzor részében, mely alapján feltételezhető lenne, hogy a feltételezett MMOS réz-ionokat köt ezáltal érzékelve a sejtben és környezetében lévő réz-ionok mennyiségét.

A feltételezett MMOS, mint minden két-komponensű szenzor regulátor rendszer, szenzor fehérjéje tartalmaz egy hisztidin-kináz foszfo-akceptor domént (HisKA). A feltételezett MMOS-ben két ún. fogadó (receiver (REC)) domént is találtam, amelyek általában a külső jel hatására áthelyeződő foszfát csoportot fogadják a hisztidin-kináz doménról egy konzervált Asp oldalláncon keresztül az ATP foszforiláz doménról. Érdekesség, hogy feltételezett MMOS tartalmaz egy hisztidin tartalmú foszfortranszfer domént is (HPT) mely néha külön fehérje molekulaként vesz részt a két-komponensű rendszerek működésében (West és Stock, 2001) (27. ábra A).

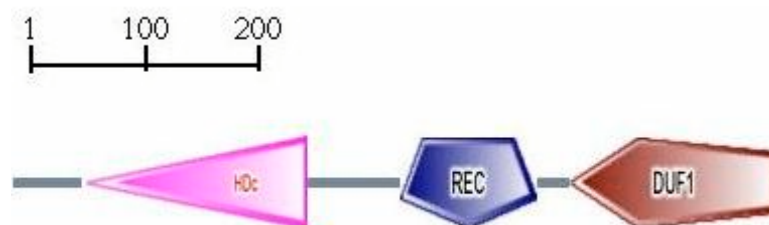


27. ábra. (A) A *M. capsulatus* (Bath) feltételezett MMOS doménjei.
Kék téglalap a transzmembrán régiót jelöli.
(B) MMOS-hez hasonló cianobakteriális szenzorok domén felépítése.

A teljes domén elrendeződés alapján (PAS-PAC-PAS-PAC-GAF-HisKA-HATPase-REC-REC-HPt), érdekes módon csak cianobakteriumokban megtalálható fehérjékkel mutat nagyfokú hasonlóságot. Aminosav szinten nem nagy a hasonlóság, de a domének elrendeződése pontosan ugyanez (27. ábra B). Sajnos a cianobaktériumokban található hasonló gének funkciója nem ismert.

A feltételezett MMOQ fehérje domén elrendeződése különbözik a tipikus regulátor fehérjékétől. A feltételezett MMOQ szintén tartalmaz egy REC domént, aminek a foszforilációja feltehetően megváltoztatja a fehérje aktivitását. A *M. capsulatus* (Bath) feltételezett MMOQ fehérjében nem találtam ismert DNS-kötő motívumot. A molekula C-terminálisán megtalálhatók a regulátorokra jellemző REC domén és GGDEF vagy más néven DUF1 domén (Galperin és *mtsai.*, 2001). Az MMOQ N-terminális, 300 aminosav hosszúságú részén egy, a HD foszfohidroláz domén családba tartozó motívum található. Érdekesség, hogy a 31-től a 220-as aminosavig terjedő szakasz nagyfokú hasonlóságot mutat egy speciális HDc foszfohidroláz doménnel, a fémfüggő foszfohidroláz doménnel (Aravind és Koonin, 1998) (28. ábra).

Az *mmoQ* lefordított szekvencia alapján azonosított fehérje motívumok nagyon valószínű, hogy a feltételezett MMOQ nem kötődik DNS-hez, hanem valamely más fehérje foszforilációs állapotának megváltoztatásával fejt ki hatását.



28. ábra. A *M. capsulatus* (Bath) MmoQ domén szerkezete.

4.3.3. Az MMOR, σ^N -függő transzkripció aktivátor

Az *mmoR* gén egy 581 aminosavat tartalmazó 63,4 kDa számított tömegű polipeptidet kódol, mely tartalmazza az összes, a σ^N -függő transzkripció aktivátorokra jellemző funkcionális domént. A σ^N aktivátor doménen és az ATPáz motívumon felül egy DNS-kötő Helix-Turn-Helix domén található a fehérje C-terminálisához közel. Az *mmoR* gén az *mmoSQ* génekkel ellentétes

orientációban íródik át. Az *mmoR* 5' régiójában azonosítható a riboszóma kötő hely és a σ^{70} kötő helyek (29. ábra). A 93-218-as aminosavak közti szakaszon található egy GAF domén, ami általában a szenzor molekulák része. Az általában c-di-GMP-t kötő GAF domén szintén megváltoztathatja a feltételezett MMOR aktivitását, ezáltal az általa szabályozott gének transzkripcióját.

```

1  GGGAGGTGAGATCTTCGGACATGGTTTCCTTGAGTTGTTGCAGGGCGTGGCGGCCGCGCGAACGGCCGCTG 71
    mmoS Met
2  GAGCAGCGGCCACCCTTGCCTGGATTGCGGCGCAGTCTAATGGCAAATCGTTCGCGGTTTCAACAGAGTA 142
     $\sigma^{70}$ -10  $\sigma^{70}$ -35
3  143 //— 267 bp —// 410
     $\sigma^{70}$ -35  $\sigma^{70}$ -10 Met mmoR
4  411 GAAGGGCAGTTGCCGTACGAAAGGTCGATCGTAGCTTCATGCCAAGGAGATAGCCGCCATGTTGAGCG 480

```

29. ábra. Az *mmoS* és *mmoR* promóter régiója.
Met jelöli MMOS és MMOR start kodonját.
A σ^{70} típusú promóterekre jellemző -10 és -35 motívumok aláhúzással vannak jelölve.

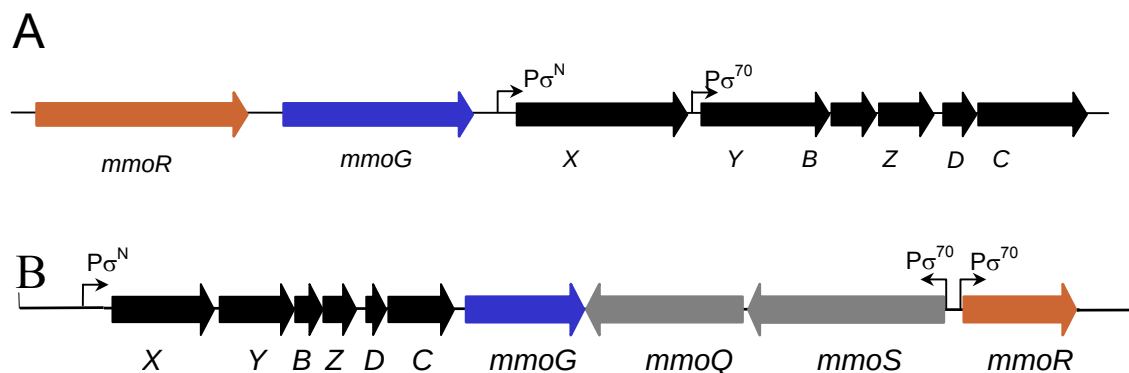
Az lefordított MMOR polipeptidben szintén nem lehet azonosítani a rézkötő MxCxxC motívumot, viszont kis hasonlóságot mutat az N-terminális részén a d1mioa jelű fém-receptor / kelatáz motívummal (pl. periplazmikus cink kötő protein (TroA) *Treponema pallidum* törzsben; kobalt kelatáz, CbiK *Salmonella typhimurium*ban). A biológiai szignifikanciát jelző E érték igen magas: E=1,6 ezért nem hagyható figyelmen kívül ez a fémkötő motívumhoz hasonló aminosav szakasz, mint potenciális fém kötő hely.

4.3.4. Az *mmoR* és *mmoG* gének összehasonlítása *M. capsulatus* (Bath) és *M. trichosporium* Ob3B törzsekben

Az *mmoG* és *mmoR* géneket csak az α -proteobaktériumokhoz tartozó, II típusú metanotrófban, a *M. trichosporium* OB3b törzsben találták meg és vizsgálták idáig (Stafford és *mtsai.*, 2003). A két törzs számos hasonlóságot és különbséget mutat a két gén tekintetében. Az *mmoG* és *mmoR* gének mindkét esetben az *smmo* struktúrgének szomszédságában találhatók, habár elhelyezkedésük különböző a struktúrgénekhez viszonyítva: az *mmoR* és az *mmoG* *mmoX*-től 5' irányban találhatók a *M. trichosporium* OB3b-ben. *mmoR*-nek feltételezhetően σ^{70} típusú promótere van *M. capsulatus* (Bath)-ban, míg a *M. trichosporium* OB3b-ban az *mmoR* nem

rendelkezik felismerhető promóter motívummal. Sem a *M. capsulatus* (Bath)-ban sem a *M. trichosporium* OB3b-ban nem található konszenzus promóter motívum az *mmoG* 5' régiójában. A feltételezett MMOG és az MMOR aminosav szekvenciái nagyfokú hasonlóságot (40%) és azonosságot (50% és 55%) mutatnak. A $\Delta mmoG$ és a $\Delta mmoR$ mutánsok azonos fenotípust mutatnak mindkét törzsben, tehát joggal feltételezhetjük, hogy funkciójuk is azonos *M. capsulatus* (Bath)-ban és *M. trichosporium* OB3b-ban.

Az *mmoS* és az *mmoQ*-hoz hasonló szekvenciákat nem találtak *M. trichosporium* OB3b-ben az sMMO struktúrgének közelében. A géntermékek pontos feladata még nem ismert, funkciójuk részletes feltérképezése további vizsgálatokat igényel. (30. ábra).



30. ábra. (A) A *M. trichosporium* Ob3B és (B) a *M. capsulatus* (Bath) *smmo* struktúrgének és feltételezett szabályozó gének elhelyezkedése.

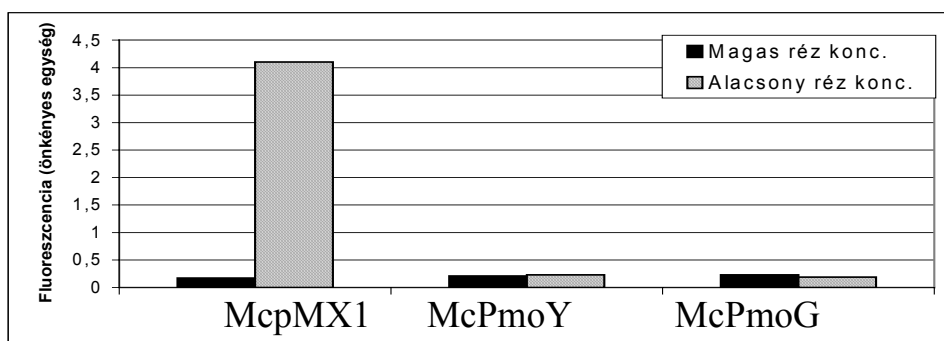
Az *mmoR* géntől 3' irányban egy olyan DNS szakasz helyezkedik el, ami különböző fajok formát dehidrogenázának gamma alegységével mutat 75-81%-os hasonlóságot aminosav szinten, ezért további régiók bázissorrendjét nem határoztam meg.

Az *mmoX* 5' régiójában található, 1 kb-nyi eddig ismeretlen szekvenciájú DNS szakaszon nem sikerült azonosítani olyan régiót, amely az adatbázisban szereplő bármely más ismert DNS szakaszhoz hasonló lenne. A teljes *M. capsulatus* (Bath) genom szekvencia ismeretében látható, hogy nincsenek további olyan gének az *mmoXYBZDCGQSR* gének környezetében, amik feltételezett funkcióik alapján kapcsolatba hozhatók sMMO rézfüggő szabályozásával.

4.4. *mmoXY* és *mmoCG* intergenikus régiók promóter aktivitása

A *M. trichosporium* Ob3B törzsben az *smmo* operonban az *mmoX* promóter régiójában azonosított σ^N típusú promóteren kívül egy másik, σ^{70} típusú promótert is azonosítottak *in silico* analízissel. *M. capsulatus* (Bath) törzsben az *mmoY* promóter régiójában nem találtam sem σ^N , sem σ^{70} típusú promóterekre jellemző DNS motívumokat.

Az *mmoSQ* és *mmoR* gének promóter régiójában sikerült promótereket azonosítani, de az *mmoG* promóter régiójában sem sikerült sem σ^N , sem σ^{70} típusú motívumokat meghatároznom, *in silico* módszerekkel. Promóter próba vektor segítségével (17. ábra) ellenőriztem *mmoX-mmoY* és *mmoC-mmoG* intergenikus régiók promóter aktivitását. Így eldönthető, hogy *mmoG*-nek van-e saját promótere, illetve található-e másik promóter *smmo* operonban, a *M. trichosporium* Ob3B törzshöz hasonlóan.



31. ábra. Az *mmoXY* és *mmoCG* intergenikus régiók promóter aktivitása. McpMX1 a vad típusú *mmoX* promóter aktivitása.

pPmoY és pPmoG plazmidokat *E. coli* S17-1 λ pir konjugációs donor törzsbe jutattam be transzformációval. Az így kapott donor törzsek segítségével konjugációval jutattam be a plazmidokat *M. capsulatus* (Bath) törzsbe, létrehozva ezzel az McPmoY és McPmoG jelű törzseket. McPmoY és McPmoG törzseket réz tartalmú és rézmentes NMS tápfolyadékban növesztettem, míg el nem érték az 1,0 optikai denzitást (540 nm-en mérve és 1 cm-es fényút hossza vonatkoztatva). A felnőtt baktérium kultúrák GFP fluoreszcencia aktivitását 3-3 ismétléssel 3-3 különböző időpontban növesztett kultúrákon mértem. Egyik törzs sem mutatott a háttér fluoreszcenciától szignifikánsan eltérő GFP aktivitást, sem magas (2 μ M) sem alacsony réz-ion koncentráció mellett növesztve (31. ábra).

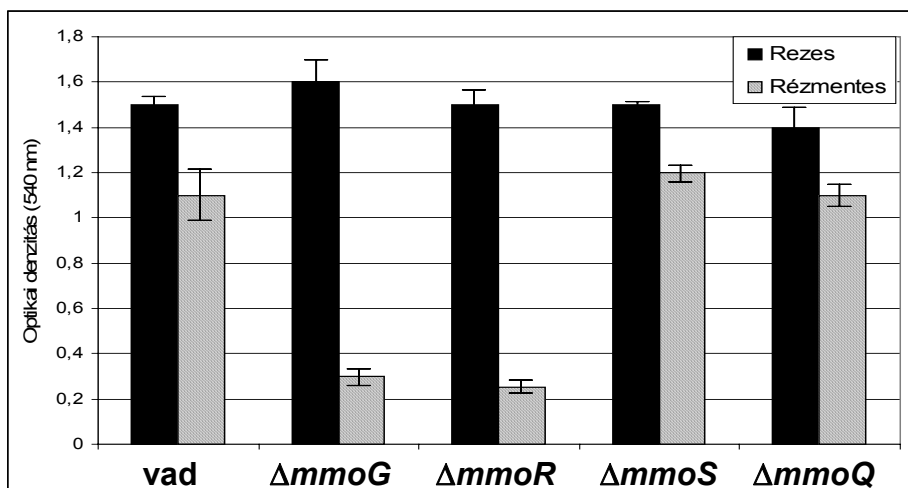
Az eredmények alapján megállapítható, hogy *mmoXY* és *mmoCG* intergenikus régiókban nincs promóter, ezek a gének együtt íródnak át ugyanarra az mRNS-re.

4.5. $\Delta mmoG$, $\Delta mmoR$, $\Delta mmoS$ és $\Delta mmoQ$ mutánsok jellemzése

Az sMMO-t kódoló struktúrgénektől 3' irányban elhelyezkedő új gének számítógépes analízise és az ez alapján feltételezett funkcióik valószínűsítették, hogy a feltételezett MMOG, MMOSQ és MMOR szerepet játszanak az sMMO működésében. Markercserés mutagenézis segítségével mutánsokat készítettem *mmoG*, *mmoR* és *mmoQ* génekre a pKmoG, pKmoR és pKQG plazmidok segítségével (ld. anyagok és módszerek 18., 19. és 20. ábrák). Az *mmoS* gén esetén nem vittem be a szelekciós markerként használt gentamicin rezisztencia gént, hanem az *mmoS* gén N-terminális részét deletáltam, így az *mmoS* génről csak 6 aminosavnyi peptid keletkezik. Erre az esetleges poláris hatás elkerülése miatt volt szükség.

A mutánsok fenotípusos jellemzése során összehasonlítottam a növekedési sebességüket, sMMO aktivitásukat, valamint az *smmo* génekről átíródó (*mmoX*) mRNS mennyiségét és a hidroxiláz alegységek meglétét 2 μ M réz-ion tartalmú tápoldatban és réz-ion mentes tápközegben nevelt kultúrák esetén. Minden esetben az azonos körülmények közt növesztett vad típusú *M. capsulatus* (Bath) szolgált kontrollként.

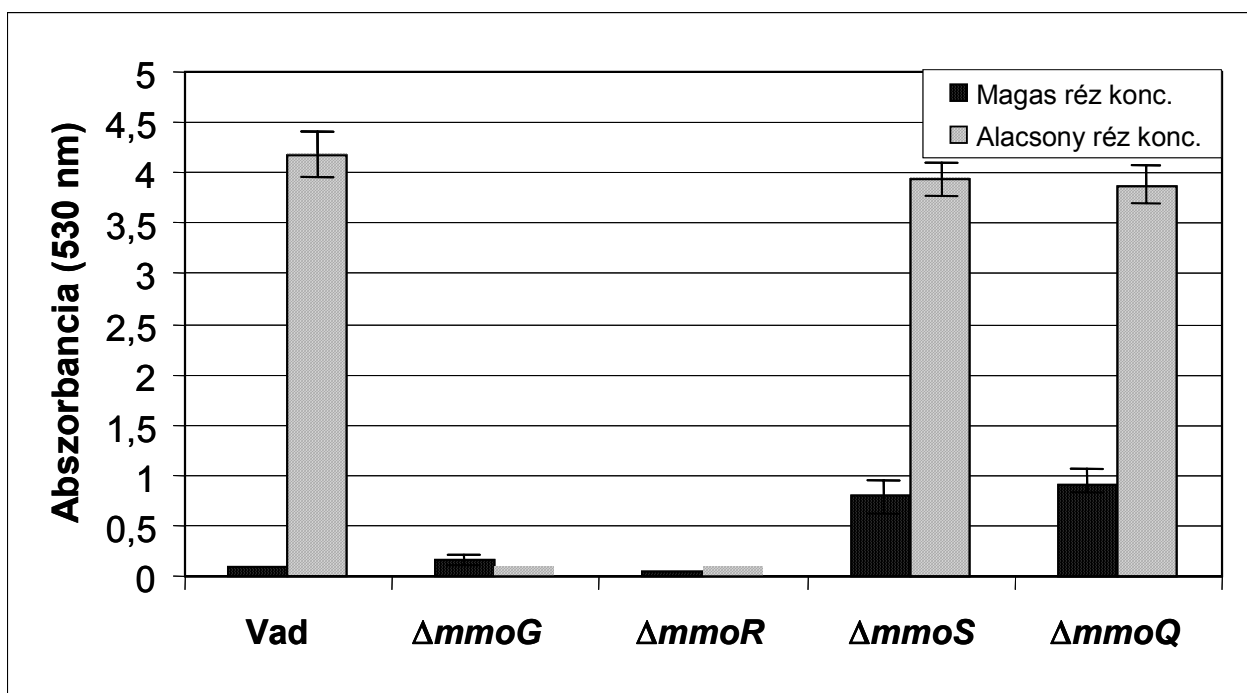
Rézmentes körülmények közt növesztve a $\Delta mmoG$ és a $\Delta mmoR$ mutánsok lényegesen lassabban nőnek mint a vad típus. A $\Delta mmoR$ és a $\Delta mmoG$ mutánsok rézmentes lemezen csak apró telepeket képeznek, majd növekedésük meg is áll. A $\Delta mmoS$ és a $\Delta mmoQ$ törzsek ugyanúgy nőnek, mint a vad típus rézmentes körülmények közt. Magas réz-ion koncentráció (2 μ M) mellett növesztve mindegyik mutáns ugyanúgy nő, mint a vad típus (32. ábra).



32. ábra. Mutáns törzsek növekedése a vad típushoz viszonyítva.

Choi és munkatársai kimutatták, hogy rézmentes körülmények közt is van minimális transzkripció a *pmo* génekről, és kevés pMMO fehérje is keletkezik (Choi és *mtsai.*, 2003b), bár a pMMO molekulánként 9 réz-iont igényel aktivitásához. Feltételezhető, hogy a $\Delta mmoG$ és a $\Delta mmoR$ mutánsok a tápközegben meglévő nagyon kis mennyiségű réz ionokat veszik fel, és így tulajdonképpen pMMO-val oxidálják a metánt rézmentes körülmények közt, így maradhatnak életben, míg teljesen el nem fogyasztják a nyomnyi mennyiségű réz-ionokat.

Megvizsgáltam a vad és mutáns törzsek sMMO aktivitását mind lemezen, mind folyadék kultúrában. A $\Delta mmoG$ és a $\Delta mmoR$ mutánsok sem alacson réz koncentrációnál (0 μ M), sem magas réz-ion koncentrációnál (2 μ M) nem mutatnak sMMO aktivitást sem lemezen, sem folyadék kultúrában. A $\Delta mmoS$, és a $\Delta mmoQ$ mutánsok réz tartalmú tápoldatban gyenge sMMO aktivitást mutat, rézmentes körülmények közt pedig a vad típusú törzzsel megegyező sMMO aktivitásuk van (33. ábra).



33. ábra. A vad és mutáns törzsek sMMO aktivitása.

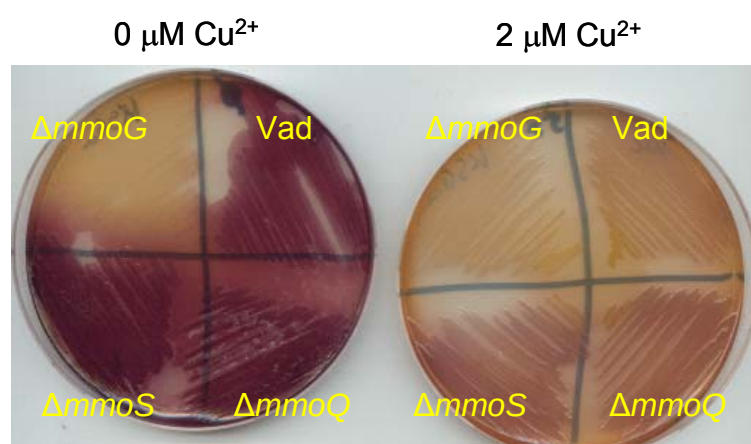
Táplemezen történő növesztéssel sokkal kifejezettebben látható a $\Delta mmoS$ és a $\Delta mmoQ$ mutánsok sMMO kifejeződése. Olyan táplemezeket készítettem, melyek növekvő mennyiségű réz-ionokat tartalmaznak. Kontrollként a $\Delta mmoG$ törzset és a vad típusú törzset használtam (4. táblázat).

4. táblázat. sMMO aktivitás a kiindulási réz-ion koncentráció függvényében folyadék kultúrában.

Törzs	Cu ²⁺ koncentráció a táptalajban (μM)								
	0	0,25	0,5	0,75	1	1,25	2	2,5	5
Vad	+++	+++	+++	++	+	-	-	-	-
$\Delta mmoG$	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\Delta mmoS$	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-
$\Delta mmoQ$	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-

+++ = erős; ++ = közepes; + = gyenge sMMO aktivitás; - = nincs sMMO aktivitás

2 μM réz-ion koncentráció volt a legmagasabb érték, ahol még sMMO aktivitása volt a $\Delta mmoS$ és a $\Delta mmoQ$ törzseknek, de a vad típus már nem mutatott aktivitást (34. ábra).



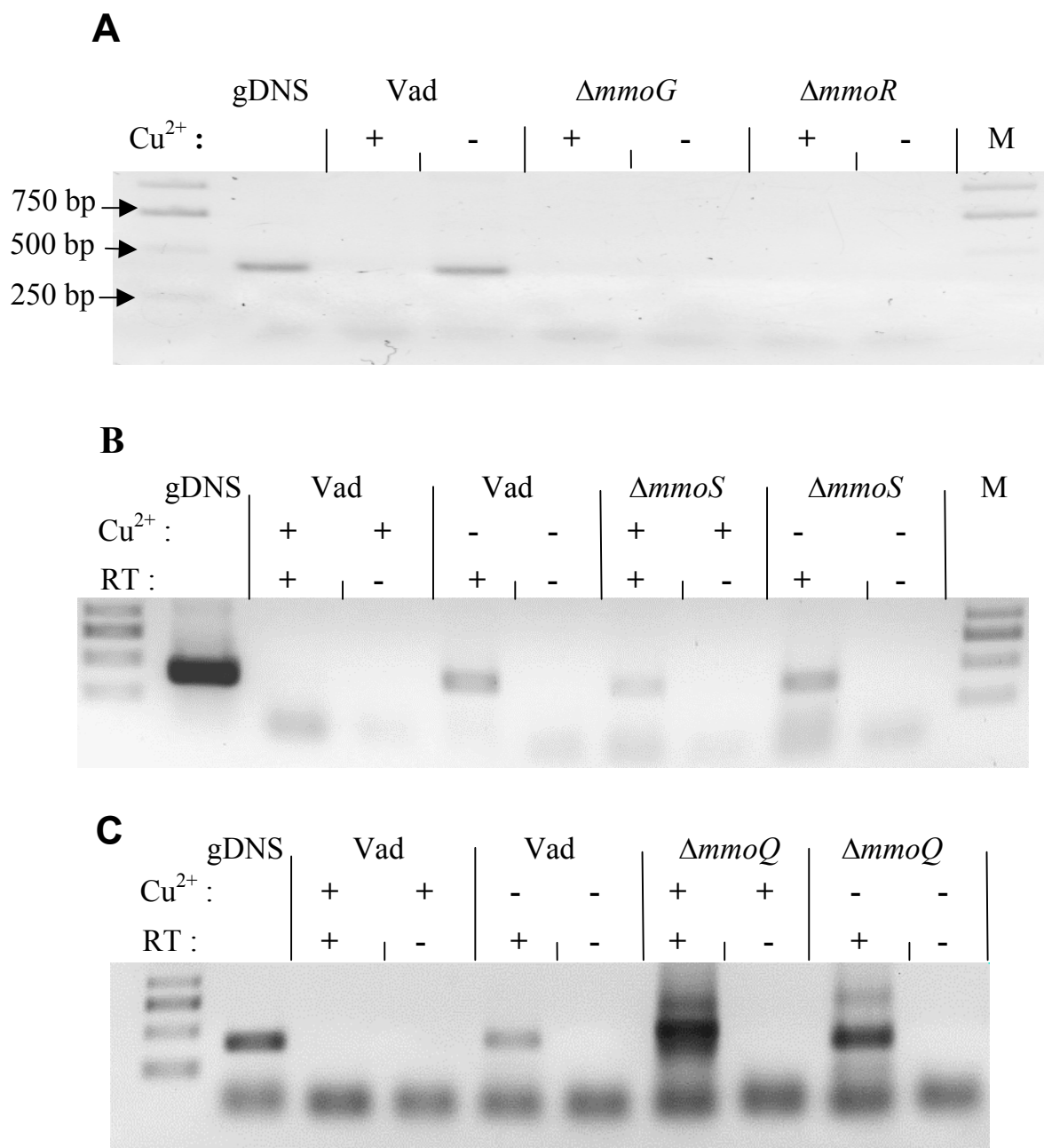
34. ábra. A mutáns törzsek sMMO aktivitása.

Mivel a réz-ionok nemcsak az sMMO transzkripcióját befolyásolják, hanem az sMMO aktivitását is gátolják a reduktáz alegység irreverzibilis inaktiválásával, pusztán az sMMO aktivitásfestés nem ad kielégítő magyarázatot arra nézve, hogy a mutánsokban a transzkripció és

a transláció hogyan változott meg olyan magas réz koncentráción történő növesztéskor, ahol már nincs detektálható sMMO aktivitása a sejteknek.

5 μM réz- iont tartalmazó, és rézmentes tápoldatban növesztettem a vad típust és a mutáns törzseket, mivel ilyen réz-ion koncentrációnál sosem mértem sMMO aktivitást. Feltételeztem, hogy a transzkripció konstitutív a $\Delta mmoS$ és a $\Delta mmoQ$ mutánsokban, így 5 μM réz-ion kiindulási koncentrációjú tápoldatban az *mmoX* promóterről keletkező mRNS-nek detektálhatónak kell lennie.

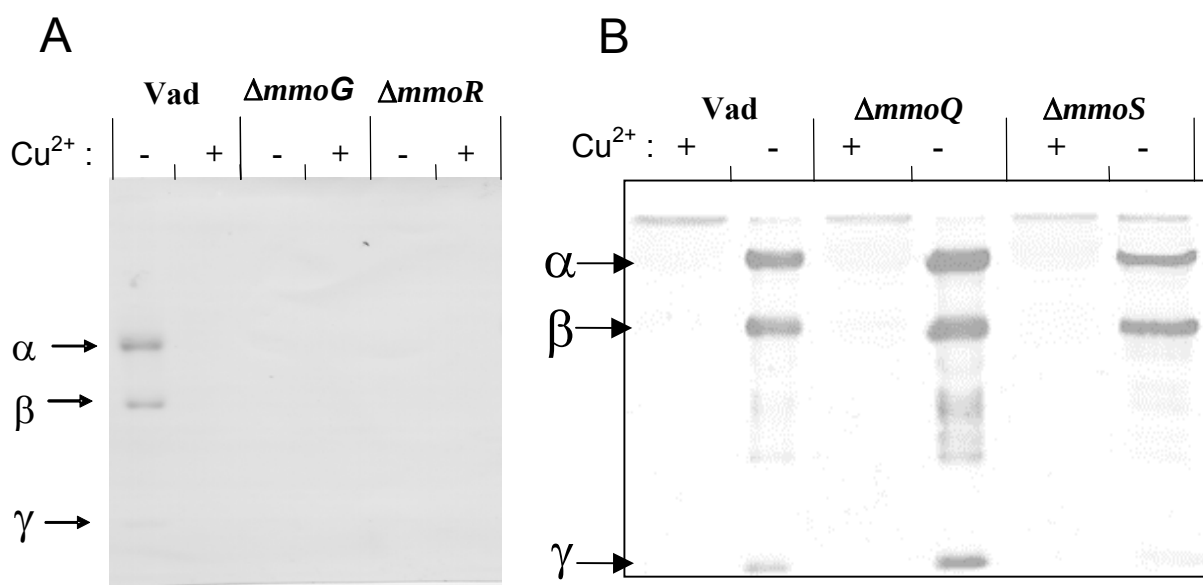
Az *smmo* gének transzkripcióját RT-PCR (reverz transzkripció csatolt PCR) segítségével határoztam meg mxatgfw és mxatgrev primerek segítségével, melyek az *mmoX* gén 5' szakaszát amplifikálják (3. táblázat). A vad típus esetén 5 μM réz-iont tartalmazó tápoldatban nincs *mmoX* transzkripció, míg rézmentes körülmények közt van. $\Delta mmoG$ és $\Delta mmoR$ mutánsokban sem 5 μM réz-iont tartalmazó tápoldatban sem rézmentes körülmények közt nincs *mmoX* transzkripció, míg a $\Delta mmoS$, $\Delta mmoQ$ törzseknél rézmentes és 5 μM réz-iont tartalmazó tápoldatban is van *mmoX* transzkripció (35. ábra). Mivel nyomnyi mennyiségű genomi DNS szennyeződés esetén is kapok PCR terméket, egy olyan kontroll reakciót is elvégeztem párhuzamosan a mintákon, amikor nem mértem reverz transzkriptáz enzimet a reakcióelegybe. Ezzel megállapítható volt, hogy a kapott termék az mRNS-ről képződött, vagy esetleges nyomnyi mennyiségű genomi DNS szennyeződésről. Az eredmények alapján megállapítható, $\Delta mmoS$ és $\Delta mmoQ$ mutánsokban az *mmoX* promóterről történő transzkripció konstitutív, a PCR termékek a reverz transzkriptáz által átírt cDNS-ről keletkeznek.



35. ábra. RT-PCR eredmények 0 μM és 5 μM kiindulási réz-ion koncentrációjú tápoldatban növesztett vad típusú és mutáns törzsek esetén.

- (A) $\Delta mmoR$ és $\Delta mmoG$ törzseknél rézmentes körülmények közt sem termelődik *mmoX* mRNS,
 (B) $\Delta mmoS$ törzsnél 5 μM kiindulási réz-ion koncentráció mellett is képződik *mmoX* mRNS,
 (C) $\Delta mmoQ$ törzsnél 5 μM kiindulási réz-ion koncentráció mellett is képződik *mmoX* mRNS.
 RT + jelöli a reverz transzkriptáz meglétét a reakcióelegyen.

Az sMMO hidroxiláz egysége ellen termeltetett ellenanyagokat felhasználva az aktivitás festések eredményeivel összhangban Western hibridizációval is megállapítottam az sMMO α , β és γ alegységek hiányát rézmentes körülmények közt növesztett $\Delta mmoG$ és $\Delta mmoR$ mutánsokban. Kimutattam továbbá, hogy réz tartalmú (5 μ M) tápoldatban egyik törzs sem tartalmaz detektálható mennyiségű hidroxilázt (36. ábra). A $\Delta mmoS$ és a $\Delta mmoQ$ mutánsokban 5 μ M kiindulási réz-ion koncentráció esetén habár van transzkripció, detektálható mennyiségű hidroxiláz nem mutatható ki. Mivel a réz-ionok irreverzibilisen inaktíválják az sMMO enzimet, feltételezhető, hogy az inaktív sMMO gyorsan lebomlik ilyen körülmények közt.



36. ábra. Western blot analízis sMMO hidroxiláz (α , β és γ) alegységei ellen termeltetett ellenanyag felhasználásával:

(A) A $\Delta mmoG$ és a $\Delta mmoR$ mutáns törzsek és

(B) a $\Delta mmoQ$ és $\Delta mmoS$ mutáns törzsek esetén.

(- = rézmentes, + = 5 μ M réz tartalmú tápoldatban növesztett sejt kultúrák)

A vad típusú és a $\Delta mmoG$, a $\Delta mmoR$, a $\Delta mmoQ$ és a $\Delta mmoS$ mutánsokon végzett fenotípus jellemzések eredményeit az 5. táblázatban foglaltam össze.

5. táblázat. A vad és mutáns törzsek fenotípusos jellemzéseinek összefoglalása.

Törzs	Növekedés			sMMO aktivitás			mRNS			α , β , γ alegységek		
	0 μ M	2 μ M	5 μ M	0 μ M	2 μ M	5 μ M	0 μ M	2 μ M	5 μ M	0 μ M	2 μ M	5 μ M
Vad	+++	+++	+++	+++	-	-	+++	-	-	+++	-	-
$\Delta mmoG$	+	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\Delta mmoR$	+	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\Delta mmoS$	+++	+++	+++	+++	++	-	+++	NT	+	+++	NT	-
$\Delta mmoQ$	+++	+++	+++	+++	++	-	+++	NT	+	+++	NT	-

NT = Nincs Tesztelve.

A fenti eredményekből látható, hogy sikerült olyan géneket azonosítani, melyek jelentősen befolyásolják sMMO rézfüggő kifejeződését.

4.6. A munkamodell

Az MMOG feltételezett fehérje aminosav sorrendje nagyfokú hasonlóságot mutat a 60 kDa-os hősokk fehérjék egyik fő típusával, a GroEL fehérjével. A GroEL központi szerepet játszik egy baktérium sejt nagyon sok frissen képződő fehérjének helyes háromdimenziós szerkezetének kialakulásában. A GroEL fehérje-komplexek szerves részét képezi még egy kis alegység, a GroES is, ennek homológja azonban nem található meg az *mmoG* környezetében. Az aminosavsorrend hasonlóság, és a $\Delta mmoG$ mutáns fenotípusa alapján valószínűsíthető, hogy a feltételezett MMOG az sMMO komplex, vagy a transzkripcióhoz szükséges valamely faktor háromdimenziós szerkezetének kialakításában játszik szerepet.

A feltételezett MMOG-vel megegyező mutás fenotípust okozott a MMOR hiánya is. A feltételezett MMOR fehérje szerkezete nagyon hasonlít a σ^N -függő transzkripciós aktivátorokra. Érdekesség, hogy a lefordított MMOR N-terminális részén található egy GAF domén. A GAF domén jellemzője sok szenzor proteinnek, cGMP-függő foszfodieszterázoknak, transzkripciós faktoroknak (*E. coli* FhlA), és bizonyos adenilil ciklázoknak.

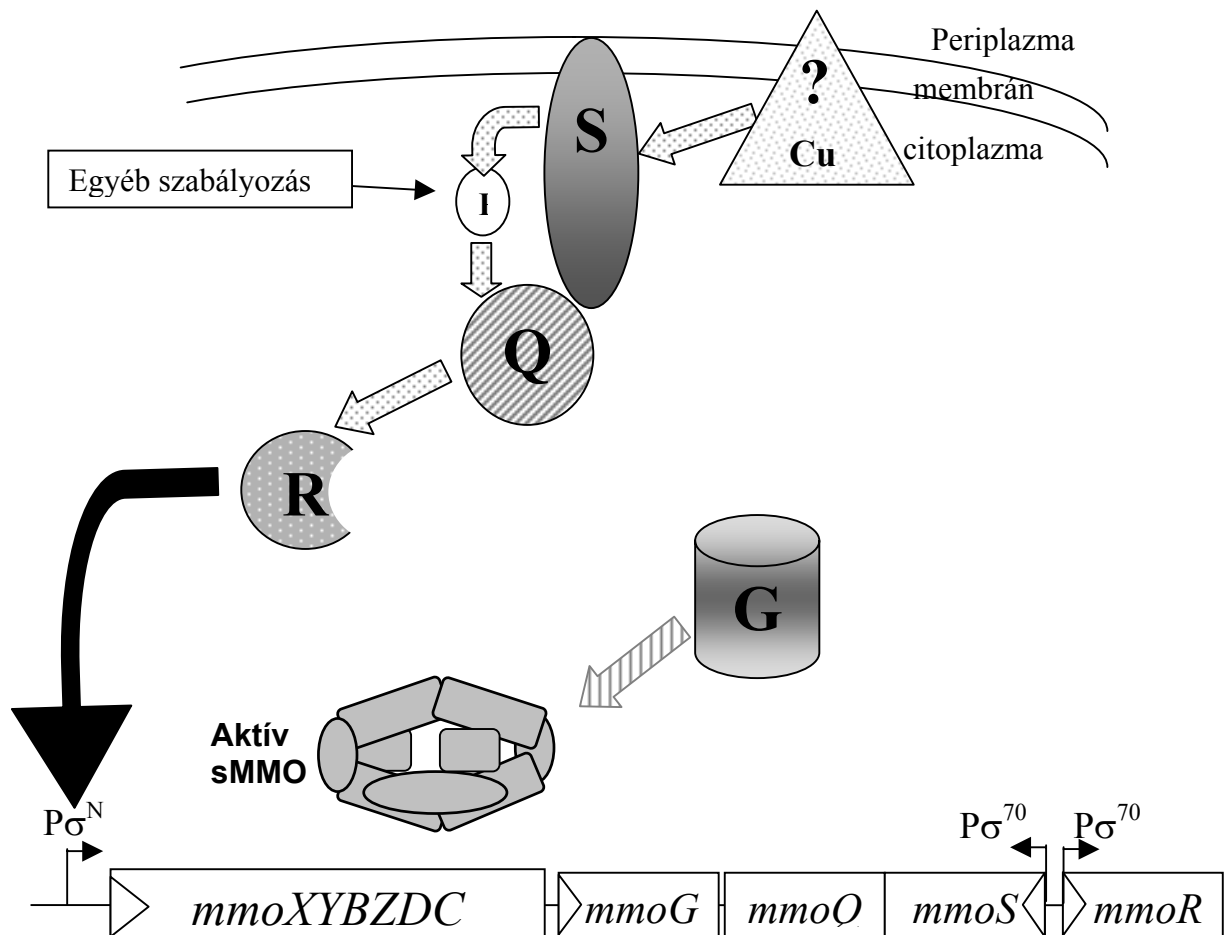
A $\Delta mmoQ$ - $\Delta mmoS$ mutánsokban RT-PCR vizsgálataim bizonyították, hogy a transzkripció konstitutív. Lehetséges, hogy az MMOS nem közvetlenül a réz ionok mennyiségét érzékeli, hanem a sejt redox állapotát, amit együttesen alakít ki a réz ionok redox hatása. A feltételezést erősíti az is, hogy a több fogadó (REC) doménnel és HPt doménnel együttesen rendelkező hibrid szenzormolekulák His-Asp transzfoszforilációs lépéseit a sejt más rendszerei is befolyásolni képesek, módosítva, finomítva ezzel a külső jel által kiváltott választ.

Az MMOQ N-terminális részén található egy fémfüggő foszfohidroláz domén (HDc). A HDc motívomot eukarióta ciklikus nukleotid foszfodieszterázokban (PDE) találtak korábban (Aravind és Koonin, 1998). A PDE-k az eukarióta sejtekben specifikusan lehasítják a 3',5'-ciklikus foszfát csoportot, létrehozva ezzel az 5'-nukleotidot, így nagyon fontos szerepet játszanak a cAMP / cGMP szint módosításában különféle stimulusok hatására. A HDc doménnek meghatározták a háromdimenziós szerkezetét. Ez a fehérje cink(II) iont köt. A cink(II) és réz(II) ionok átmérője csak mindössze 1pm eltérést mutat, atomtömegük is nagyon hasonló, így legtöbbször helyettesíthetik egymást biológiai rendszerekben. Jó példa erre a *M. capsulatus* (Bath)-ból tisztított, aktív, cink tartalmú pMMO enzim, amelyben a pMMO molekulánként jelenlévő 15 réz-ionból 8-at helyettesítettek cink(II) ionokkal miközben pMMO aktív maradt (Chen és mtsai., 2004).

MMOQSR polipeptidek fehérje motívumain végigtekintve szembeötlő a cGMP-vel, c-di-GMP-vel kapcsolatos domének „sokasága”. Mivel a c-di-GMP-t a baktériumok másodlagos hírvivő molekulájának is nevezik (D'Argenio és Miller, 2004) lehetséges, hogy MMOQS a sejt globális cGMP/ c-di-GMP szintjét befolyásolni tudja külső stimulusok hatására.

Az általam felállított munkamodell szerint MMOSQ és MMOR konstitutívan termelődik a sejtekben a megfelelő σ^{70} típusú promóterekről. MMOS érzékeli valamilyen módon a réz ionok mennyiségét. MMOS a plazmamembránba van horgonyozva az N-terminálisán lévő transzmembrán doménnel, a fehérje többi része a citoplazmában van. Alacsony réz-ion koncentráció esetén MMOS aktiválja MMOQ-t, ami aktiválja MMOR-t. Aktív MMOR elindítja a transzkripciót a σ^N típusú *mmoX* promóterről. Mivel az MMOS egy összetett szerkezetű szenzor fehérje, lehetséges, hogy a sejt más jelátvivő rendszerei (c-di-GMP-n keresztül) is befolyásolják MMOS aktivitását az MMOS-ről MMOQ-ra történő transzfoszforilációs lépések valamelyikének befolyásolásával, ezáltal lehetővé válik, hogy esetleg a sejt környezetében jelen

levő metán és oxigén mennyisége is befolyásolja sMMO termelődését. Az sMMO alegységekkel együtt termelődő MMOG részt vesz az aktív sMMO kialakításában (37. ábra).



37. ábra. Az sMMO rézfüggő transzkripció szabályozásának modellje.

4.7. A konjugáció optimalizálása transzpozonos mutagenézishez

2005-ben ismertté vált a *M. capsulatus* (Bath) genomja. Mivel *mmoGQSR* gének vizsgálata során nem egyértelmű, hogy a *M. capsulatus* (Bath) hogyan érzékeli a réz-ionok mennyiségét, feltételezhető, hogy a folyamatban más gének fehérje termékei is részt vesznek, melyek nem az eddig megismert gének környezetében helyezkednek el. Az ilyen gének azonosítására kitűnő módszer a transzpozonos mutagenézis.

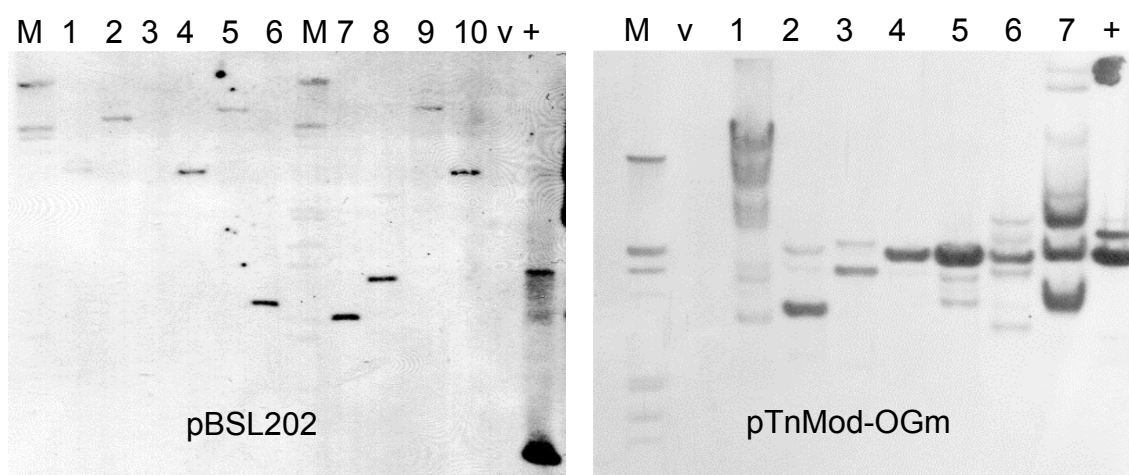
A *M. capsulatus* (Bath) törzsben már sokan próbálkoztak transzpozonos mutagenézissel, eddig sikertelenül. Amennyiben előállítható megfelelő számú transzpozonos mutáns, kereshetők olyan mutánsok, melyekben megváltozott az sMMO kifejeződése a vad típushoz képest.

Mivel a konjugációban alkalmazott vektorok nagyon meghatározzák a konjugáció gyakoriságát, több mini-transzpozont hordozó, szűk gazdaspecificitású, mobilizálható plazmidot teszteltem *M. capsulatus* (Bath) törzsben. A pLOF mini Tn10 Km plazmid kivételével mindegyik minitranszpozon a Tn5-ös transzpozon-ból készült. Meghatároztam a *M. capsulatus* (Bath) kanamicinnel (Km) gentamicinnel (Gm) és streptomiccinnel (Sm) szemben mutatott rezisztenciáját 0, 1, 3, 5, 7, 10, 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ antibiotikum tartalmú NMS táplemezekeken, melyekre 1 ml sejt tenyészetet szélesztettem. A kanamicin és gentamicin már 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ -es koncentrációban is jelentősen hátráltatták a sejtek növekedését, de megbízhatóan csak 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ antibiotikum tartalom felett gátolták szaporodásukat. Streptomicin esetén $2,7 \times 10^{-8}$ gyakorisággal spontán rezisztenseket kaptam, ezért nem használtam a továbbiakban a streptomicin rezisztenciát hordozó mini-transzpozont. A transzpozonos mutánsok szelektálásához 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ koncentrációban alkalmaztam a kanamicint és gentamicint. A pTnMod mini-transzpozonok különlegesebbek abból a szempontból, hogy a szűk gazdaspecificitású, nagy kópiaszámot biztosító replikációs origót a mobilis elem tartalmazza, ami megkönnyítheti a transzpozont határoló genomi régió klónozását, azonosítását. A 3. táblázatban megadott plazmidokat tartalmazó törzsekkel végeztem konjugációt *M. capsulatus* (Bath) recipiens törzzsel és meghatároztam a transzpozonos mutánsok gyakoriságát (6. táblázat). Mivel a pTnMod-OGm-et használva megfelelő gyakorisággal kaptam transzpozonos mutánsokat, Southern hibridizációval meghatároztam, hogy a kapott *M. capsulatus* (Bath) transzpozonos mutánsok a mobilis elemet egy példányban, a genomban véletlenszerűen elszórva integrálódva tartalmazzák. Próbaként a Gm rezisztencia gén (*aacC3*) egy szakaszát használtam (22. ábra). A Southern

kísérlet eredmény jól mutatja, hogy a pTnMod-OGm mobilis eleme több példányban fordul elő ugyanazon mutánsban, ezért ez a vektor nem alkalmazható mutagenézishoz, mert a mutációk okozta fenotípus nem feleltethető meg kizárólag egy genomi régióknak. A pBSL202 plazmiddal hasonlóan nagy gyakorisággal kaptam transzkonjugánsokat. Ezekből is megvizsgáltam Southern hibridizációval néhány mutánst (38. ábra). Az eredmény egyértelműen bizonyítja, hogy a pBSL202 mini-transzpozonnal megfelelő gyakorisággal állíthatók elő olyan *M. capsulatus* (Bath) mutánsok, amelyekben a mini-transzpozon egy példányban van jelen és a genomban véletlenszerű eloszlást mutat. A többi transzpozonnal nem kaptam megfelelő mennyiségű mutánst, ezért azokat nem használtam a továbbiakban.

6. táblázat Transzpozonos mutagenézis optimalizálásához felhasznált plazmidok.

Plazmid	Mobilis elem rezisztencia	Gyakoriság	Referencia
pLOF mini Tn10 Km	Km	0	Delorenzo és mtsai., (1990)
pUT Tn5 Km	Km	3×10^{-9}	Delorenzo és mtsai., (1990)
pTnMod-OGm	Gm	6.7×10^{-9}	Dennis és Zylstra, (1998)
pTnMod-SmO	Sm	2.3×10^{-6}	Dennis és Zylstra, (1998)
pTnMod-OKm	Km	1.6×10^{-4}	Dennis és Zylstra, (1998)
pTnMod-OGm	Gm	1.6×10^{-4}	Dennis és Zylstra, (1998)
pTNG	Gm	4×10^{-7}	Tang, Lu, és Pan, (1999)
pAG408	Gm	5.5×10^{-7}	Suarez és mtsai., (1997)
pBSL202	Gm	3×10^{-4}	Alexeyev és mtsai., (1995)
pBSL118	Km	7.6×10^{-4}	Alexeyev és mtsai., (1995)



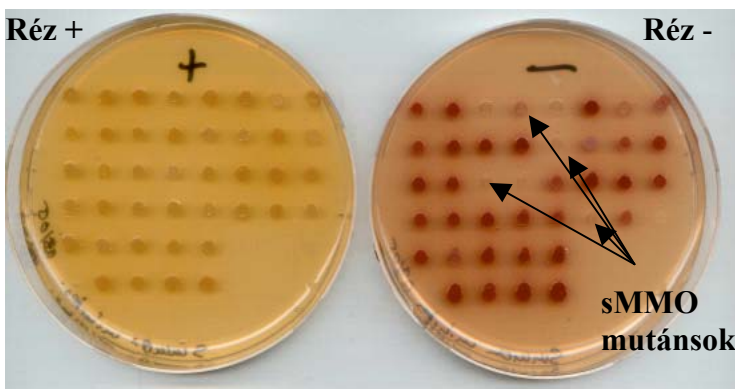
38. ábra Southern hibridizáció. M: marker; v: vad típus; +: pozitív kontroll

4.8. *sMMO* mutánsok előállítása transzpozonos mutagenézissel

pBSL202 mini-transzpozonnal 10000 kolóniát állítottam elő, melyeket réz-ion tartalmú ($5\text{ }\mu\text{M}$) és rézmentes $10\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$ gentamicint tartalmazó NMS táptalajra oltottam le, lemezenként 48 telepet. A lemezeket 43°C -on, metán tartalmú légkörben inkubáltam 10-14 napig. Az inkubáció során 3 naponta ellenőriztem a telepek növekedését, és összehasonlítottam ugyanazon mutánsok növekedési sebességét a réz-ion tartalmú és rézmentes lemezeken. 10-14 nap elteltével aktivitás festéssel ellenőriztem a mutánsok *sMMO* aktivitását a módszerekben leírtak szerint. 77 olyan mutánst azonosítottam, amelyek nőttek rézmentes táptalajon, de nem mutattak *sMMO* aktivitást (39. ábra).

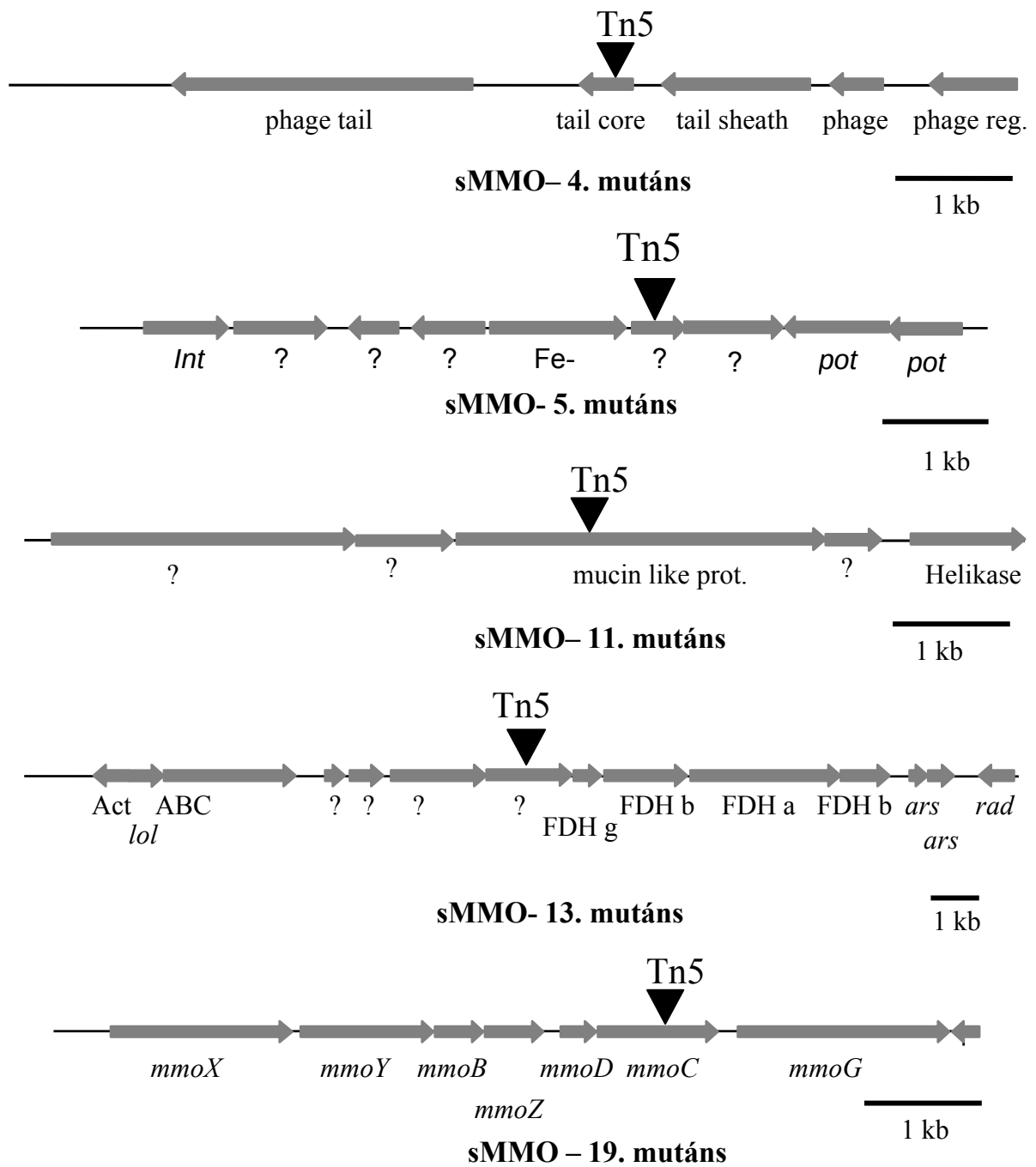
Találomra kiválasztottam néhány *sMMO* mutánst és meghatároztam a mini-transzpozon beépülésének helyét a genomban. A mutáció helyének tágabb környezetét a munkám közben

publikussá vált teljes
genomszekvenvia alapján
határoztam meg (40. ábra). Az
egyik mutánsban az *sMMO*
struktúrgénbe integrálódott a
transzpozon, egy másikban fág
fehérjét kódoló DNS szakaszba,
de a legtöbb mutánsban a mutáns gén
ismeretlen funkciójú konzervált
génekkkel mutat hasonlóságot az



(39. ábra). Az *sMMO* mutánsok aktivitásfestése $2\text{ }\mu\text{M}$ és $0\text{ }\mu\text{M}$ Cu^{2+} tartalmú táptalajokon.

adatbázisokban (40. ábra). A kapott eredmények alátámasztják, hogy izolálhatók olyan mutánsok melyekben az *sMMO* kifejeződése megváltozott. A módszer működőképességét bizonyítja az *mmoC* mutáns. A többi mutáns esetén pusztán a mutáns gének más génekkel mutatott hasonlóságok alapján nem jelezhető előre az *sMMO* szabályozásában betöltött szerepük. A továbbiakban szükség van a mutánsok részletesebb vizsgálatára, valamint a többi mutánsban meg kell határozni a transzpozon helyét!



40. ábra. A transzpozon beépülésének helye a különböző, sMMO aktivitásban sérült mutánsokban.

A 40. ábrán látható, hogy az első 5 megvizsgált mutánsban csak az *smmo* operonban mutáns törzsnél lehet megmagyarázni a kapott fenotípust a gének ismeretében. A többi mutánsban a transzpozon beépülésének környezetében azonosított DNS szakaszok olyan génekkel mutatnak hasonlóságot, amelyeknek vagy még egyáltalán nem ismert a funkciója (5. és 13. mutáns), vagy a feltételezett funkciót nem lehet egyértelműen az sMMO rézfüggő kifejeződésével kapcsolatba hozni (4., 11. és 19. mutáns). Remélhetőleg, a többi mutáns elemzése alapján egyértelműbb következtetések vonhatók le a mutáns gének sMMO kifejeződésének szabályozásában betöltött szerepére.

Az sMMO- transzpozonos mutánsok esetében is tapasztalható, hogy sok ismeretlen funkciójú, konzervált, feltételezett fehérje játszik szerepet a normális sMMO aktivitás kialakulásában, ezért a transzpozonos mutagenézis az első lépés lehet ezen ismeretlen funkciójú gének pontos fiziológiás szerepének feltárásában.

A dolgozatban leírt új tudományos eredmények

- 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 kodonjához viszonyítva -358 és -280 bázispárok közé eső, IHF kötő hely és az ettől 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 *mmoXYBZCG* sMMO struktúrgéneket tartalmazó operonban található *mmoXY* és *mmoCG* intergenikus régióknak nincs promóter aktivitása. Az eredmények alapján feltételeztem, hogy *mmoXYBZCG* 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 vezettem le a *mmoG*, *mmoQ*, *mmoS* és *mmoR* gének fehérjetermékeinek feltételezett funkcióját ismert fehérjékhez való hasonlóságuk alapján: az MMOG egy GroEL-hez hasonló chaperonin, az MMOS a két-komponensű szenzor-regulátor rendszerek szenzor fehérjéjével, az MMOQ a regulátor fehérjéjével mutat nagyfokú rokonságot. MMOR felépítése megegyezik a σ^N -függő transzkripció 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 rézmentes körülmények közt.
- VIII. Megmutattam, hogy *mmoS* és *mmoQ* mutánsokban az *mmoX* 5' régiójában lévő σ^N típusú promóter konstitutívan működik. 2 μ M réz-szulfátot tartalmazó táplemezen még sMMO aktivitás mérhető *mmoS* és *mmoQ* mutánsokban, míg a vad típusban nincs sMMO aktivitás ilyen réz-ion koncentráció mellett. 5 μ M rézszulfátot tartalmazó médiumban nem mérhető sMMO aktivitás *mmoS* és *mmoQ* mutánsokban. Megmutattam, hogy ilyen körülmények között az sMMO alegységei nem mutathatók ki, de mRNS képződik az *mmoX* promóterről.
- IX. 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.

- X. 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 rézfüggő szabályozása igen összetett folyamat *M. capsulatus* (Bath) törzsben.

Hivatkozások jegyzéke

- Alexeyev,M.F., Shokolenko,I.N., és Croughan,T.P. (1995) New mini-Tn5 derivatives for insertion mutagenesis and genetic-engineering in Gram-negative bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* **41**: 1053-1055.
- Aravind,L. és Koonin,E.V. (1998) The HD domain defines a new superfamily of metal-dependent phosphohydrolases. *Trends in Biochemical Sciences* **23**: 469-472.
- Aravind,L. és Ponting,C.P. (1997) The GAF domain: an evolutionary link between diverse phototransducing proteins *Trends in Biochemical Sciences* **22**: 458-459.
- Barrios,H., Valderrama,B., és Morett,E. (1999) Compilation and analysis of sigma⁵⁴-dependent promoter sequences. *Nucleic Acids Research* **27**: 4305-4313.
- Berson,O. és Lidstrom,M.E. (1997) Cloning and characterization of corA, a gene encoding a copper-repressible polypeptide in the type I methanotroph, *Methylococcum albus* BG8. *FEMS Microbiology Letters* **148**: 169-174.
- Callaghan,A.J., Smith,T.J., Slade,S.E., és Dalton,H. (2002) Residues near the N-terminus of protein B control autocatalytic proteolysis and the activity of soluble methane mono-oxygenase. *European Journal of Biochemistry* **269**: 1835-1843.
- Chen,C.L., Chen,K.H.C., Ke,S.C., Yu,S.S.F., és Chan,S.I. (2004) Preparation and characterization of a (Cu, Zn)-pMMO from *Methylococcus capsulatus* (Bath). *Journal of Inorganic Biochemistry* **98**: 2125-2130.
- Chistoserdova,L., Vorholt,J.A., és Lidstrom,M.E. (2005) A genomic view of methane oxidation by aerobic bacteria and anaerobic archaea. *Genome Biology* **6**: 345-358.
- Choi,D.W., Kunz,R.C., Boyd,E.S., Semrau,J.D., Antholine,W.E., Han,J.I., Zahn,J.A., Boyd,J.M., de la Mora,A.M., és DiSpirito,A.A. (2003a) The membrane-associated methane monooxygenase (pMMO) and pMMO-NADH : quinone oxidoreductase complex from *Methylococcus capsulatus* (Bath). *Journal of Bacteriology* **185**: 5755-5764.
- Colby,J. és Dalton,H. (1978) Resolution of the methane mono-oxygenase of *Methylococcus capsulatus* (Bath) into three components. Purification and properties of component C, a flavoprotein. *Biochemical Journal* **171**: 461-468.
- Colby,J., Stirling,D.I., and Dalton,H. (1977) The soluble methane mono-oxygenase of *Methylococcus capsulatus* (Bath). Its ability to oxygenate n-alkanes, n-alkenes, ethers, and alicyclic, aromatic and heterocyclic compounds. *Biochemical Journal* **165**: 395-402.

- Colladovides, J., Magasanik, B., és Gralla, J.D. (1991) Control site location and transcriptional regulation in *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews* **55**: 371-394.
- D'Argenio, D.A. és Miller, S.I. (2004) Cyclic di-GMP as a bacterial second messenger. *Microbiology-Sgm* **150**: 2497-2502.
- Dedysh, S.N., Horz, H.P., Dunfield, P.F., és Liesack, W. (2001) A novel *pmoA* lineage represented by the acidophilic methanotrophic bacterium *Methylocapsa acidophila* B2. *Archives of Microbiology* **177**: 117-121.
- Delorenzo, V., Herrero, M., Jakubzik, U., és Timmis, K.N. (1990) Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in Gram-negative eubacteria *Journal of Bacteriology* **172**: 6568-6572.
- Dennis, J.J. és Zylstra, G.J. (1998) Plasmids: Modular self-cloning minitransposon derivatives for rapid genetic analysis of Gram-negative bacterial genomes. *Applied and Environmental Microbiology* **64**: 2710-2715.
- Fitch, M.W., Graham, D.W., Arnold, R.G., Agarwal, S.K., Phelps, P., Speitel, G.E., és Georgiou, G. (1993) Phenotypic characterization of copper-resistant mutants of *Methylosinus trichosporium* Ob3B. *Applied and Environmental Microbiology* **59**: 2771-2776.
- Fliermans, C.B., Phelps, T.J., Ringelberg, D., Mikell, A.T., és White, D.C. (1988) Mineralization of trichloroethylene by heterotrophic enrichment cultures. *Applied and Environmental Microbiology* **54**: 1709-1714.
- Galperin, M.Y., Nikolskaya, A.N., és Koonin, E.V. (2001) Novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction systems. *FEMS Microbiology Letters* **203**: 11-21.
- Green, J. és Paget, M.S. (2004) Bacterial redox sensors. *Nature Reviews Microbiology* **2**: 954-966.
- Green, J., Prior, S.D., és Dalton, H. (1985) Copper ions as inhibitors of protein C of soluble methane monooxygenase of *Methylococcus capsulatus* (Bath). *Eur. J. Biochem.* **153**: 137-144.
- Hallam, S.J., Putnam, N., Preston, C.M., Detter, J.C., Rokhsar, D., Richardson, P.M., and Delong, E.F. (2004) Reverse methanogenesis: Testing the hypothesis with environmental genomics. *Science* **305**: 1457-1462.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* **166**: 557-580.
- Hansen, L.B., Finster, K., Fossing, H., és Iversen, N. (1998) Anaerobic methane oxidation in sulfate depleted sediments: effects of sulfate and molybdate additions. *Aquatic Microbial Ecology* **14**: 195-204.
- Hanson, R.S. és Hanson, T.E. (1996) Methanotrophic bacteria *Microbiological Reviews* **60**: 439-471.

Haseloff, J. (1999) GFP variants for multispectral imaging of living cells. *Methods in Cell Biology*, Vol 58 **58**: 139-140.

Herrero, M., Delorenzo, V., és Timmis, K.N. (1990) Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in Gram-negative bacteria. *Journal of Bacteriology* **172**: 6557-6567.

Hoch, J.A. (2000) Two-component and phosphorelay signal transduction. *Current Opinion in Microbiology* **3**: 165-170.

Houghton, J.T., Ding, Y., Griggs, D.J., Nouger, van der Linden, P.J., Dai, X., Maskell, K. és Johnson, C.A., eds (2001) Climate change 2001: The Scientific Basis: Contributions of Working Group I to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate change eds. Houghton, J.T., Ding, Y., Griggs, D.J., Nouger, van der Linden, P.J., Dai, X., Maskell, K. és Johnson, C.A., (Cambridge Univ. Press., Cambridge, U.K.), pp. 349-416.

Inoue, H., Nojima, H., és Okayama, H. (1990) High-efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**: 23-28.

Kao, W.C., Chen, Y.R., Yi, E.C., Lee, H., Tian, Q., Wu, K.M., Tsai, S.F., Yu, S.S.F., Chen, Y.J., Aebersold, R., és Chan, S.I. (2004) Quantitative proteomic analysis of metabolic regulation by copper ions in *Methylococcus capsulatus* (Bath). *Journal of Biological Chemistry* **279**: 51554-51560.

Kelly, D.P., Anthony, C., és Murrell, J.C. (2005) Insights into the obligate methanotroph *Methylococcus capsulatus*. *Trends in Microbiology* **13**: 195-198.

Kim, H.J., Graham, D.W., DiSpirito, A.A., Alterman, M.A., Galeva, N., Larive, C.K., Asunskis, D., és Sherwood, P.M.A. (2004) Methanobactin, a copper-acquisition compound from methane-oxidizing bacteria. *Science* **305**: 1612-1615.

Kovach, M.E., Elzer, P.H., Hill, D.S., Robertson, G.T., Farris, M.A., Roop, R.M., és Peterson, K.M. (1995) 4 New derivatives of the broad-host-range cloning vector Pbb1Mcs, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**: 175-176.

Leahy, J.G., Batchelor, P.J., és Morcomb, S.M. (2003) Evolution of the soluble diiron monooxygenases *FEMS Microbiology Reviews* **27**: 449-479.

Lieberman, R.L. és Rosenzweig, A.C. (2005) Crystal structure of a membrane-bound metalloenzyme that catalyses the biological oxidation of methane. *Nature* **434**: 177-182.

Lipscomb, J.D. (1994) Biochemistry of the soluble methane monooxygenase. *Annual Review of Microbiology* **48**: 371-399.

Liu, K.E., Valentine, A.M., Qiu, D., Edmondson, D.E., Appelman, E.H., Spiro, T.G., és Lippard, S.J. (1997) Characterization of a diiron(III) peroxo intermediate in the reaction cycle of methane monooxygenase hydroxylase from *Methylococcus capsulatus* (Bath). *Journal of the American Chemical Society* **119**: 11134-11139.

- Malpica,R., Franco,B., Rodriguez,C., Kwon,O., és Georgellis,D. (2004) Identification of a quinone-sensitive redox switch in the ArcB sensor kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 13318-13323.
- Martin,H. és Murrell,J.C. (1995) Methane monooxygenase mutants of *Methylosinus trichosporium* constructed by marker-exchange mutagenesis. *FEMS Microbiology Letters* **127**: 243-248.
- Merkx,M. és Lippard,S.J. (2002) Why OrfY? Characterization of MMOD, a long overlooked component of the soluble methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath). *Journal of Biological Chemistry* **277**: 5858-5865.
- Miller,W.G., Leveau,J.H.J., és Lindow,S.E. (2000) Improved gfp and inaZ broad-host-range promoter-probe vectors. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**: 1243-1250.
- Murrell,J.C. (1992) Genetics and molecular biology of methanotrophs. *FEMS Microbiological Reviews* **8**: 233-248.
- Nielsen,A.K., Gerdes,K., Degn,H., és Murrell,J.C. (1996) Regulation of bacterial methane oxidation: transcription of the soluble methane mono-oxygenase operon of *Methylococcus capsulatus* (Bath) is repressed by copper ions. *Microbiology* **142**: 1289-1296.
- Nielsen,A.K., Gerdes,K., és Murrell,J.C. (1997) Copper-dependent reciprocal transcriptional regulation of methane monooxygenase genes in *Methylococcus capsulatus* and *Methylosinus trichosporium*. *Molecular Microbiology* **25**: 399-409.
- Peltola,P., Priha,P., és Laakso,S. (1993) Effect of copper on membrane-lipids and on methane monooxygenase activity of *Methylococcus capsulatus* (Bath). *Archives of Microbiology* **159**: 521-525.
- Phelps,P.A., Agarwal,S.K., Speitel,G.E., és Georgiou,G. (1992) *Methylosinus trichosporium* Ob3B mutants having constitutive expression of soluble methane monooxygenase in the presence of high-levels of copper. *Applied and Environmental Microbiology* **58**: 3701-3708.
- Ranson,N.A., White,H.E., és Saibil,H.R. (1998) Chaperonins. *Biochemical Journal* **333**: 233-242.
- Richards,A.O., Stanley,S.H., Suzuki,M., és Dalton,H. (1994) The biotransformation of propylene to propylene-oxide by *Methylococcus capsulatus* (Bath) .3. Reactivation of inactivated whole cells to give a high productivity system. *Biocatalysis* **8**: 253-267.
- Rosenzweig,A.C., Frederick,C.A., és Lippard,S.J. (1992) Crystallization and preliminary X-ray analysis of the methane monooxygenase hydroxylase protein from *Methylococcus capsulatus* (Bath). *Journal of Molecular Biology* **227**: 583-585.
- Rosenzweig,A.C., Nordlund,P., Takahara,P.M., Frederick,C.A., és Lippard,S.J. (1995) Geometry of the soluble methane monooxygenase catalytic diiron center in 2 oxidation-states. *Chemistry & Biology* **2**: 409-418.

- Schafer, A., Tauch, A., Jager, W., Kalinowski, J., Thierbach, G., és Puhler, A. (1994) Small mobilizable multipurpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids Pk18 and Pk19 - selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**: 69-73.
- Semrau, J.D., Chistoserdov, A., Lebron, J., Costello, A., Davagnino, J., Kenna, E., Holmes, A.J., Finch, R., Murrell, J.C., és Lidstrom, M.E. (1995) Particulate methane monooxygenase genes in methanotrophs. *Journal of Bacteriology* **177**: 3071-3079.
- Shigematsu, T., Hanada, S., Eguchi, M., Kamagata, Y., Kanagawa, T., és Kurane, R. (1999) Soluble methane monooxygenase gene clusters from trichloroethylene-degrading *Methylomonas* sp. strains and detection of methanotrophs during *in situ* bioremediation. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 5198-5206.
- Southward, C.M. és Surette, M.G. (2002) The dynamic microbe: green fluorescent protein brings bacteria to light. *Molecular Microbiology* **45**: 1191-1196.
- Stafford, G.P., Scanlan, J., McDonald, I.R., és Murrell, J.C. (2003) *rpoN*, *mmoR* and *mmoG*, genes involved in regulating the expression of soluble methane monooxygenase in *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Microbiology-Sgm* **149**: 1771-1784.
- Stainthorpe, A.C., Lees, V., Salmond, G.P., Dalton, H., és Murrell, J.C. (1990) The methane monooxygenase gene cluster of *Methylococcus capsulatus* (Bath). *Gene* **91**: 27-34.
- Stainthorpe, A.C., Murrell, J.C., Salmond, G.P., Dalton, H., és Lees, V. (1989) Molecular analysis of methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath). *Archives of Microbiology* **152**: 154-159.
- Stanley, S.H., Prior, S.D., Leak, D.J., és 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. *Biotechnology Letters* **5**: 487-492.
- Stolyar, S., Franke, M., és Lidstrom, M.E. (2001) Expression of individual copies of *Methylococcus capsulatus* bath particulate methane monooxygenase genes. *Journal of Bacteriology* **183**: 1810-1812.
- Suarez, A., Guttler, A., Stratz, M., Staendner, L.H., Timmis, K.N., és Guzman, C.A. (1997) Green fluorescent protein-based reporter systems for genetic analysis of bacteria including monocopy applications. *Gene* **196**: 69-74.
- Tang, X., Lu, B.F., és Pan, S.Q. (1999) A bifunctional transposon mini-Tn5gfp-km which can be used to select for promoter fusions and report gene expression levels in *Agrobacterium tumefaciens*. *FEMS Microbiology Letters* **179**: 37-42.
- Valentine, D.L. és Reeburgh, W.S. (2000) New perspectives on anaerobic methane oxidation. *Environmental Microbiology* **2**: 477-484.

Ward,N., Larsen,O., Sakwa,J., Bruseth,L., Khouri,H., Durkin,A.S., Dimitrov,G., Jiang,L.X., Scanlan,D., Kang,K.H., Lewis,M., Nelson,K.E., Methe,B., Wu,M., Heidelberg,J.F., Paulsen,I.T., Fouts,D., Ravel,J., Tettelin,H., Ren,Q.H., Read,T., Deboy,R.T., Seshadri,R., Salzberg,S.L., Jensen,H.B., Birkeland,N.K., Nelson,W.C., Dodson,R.J., Grindhaug,S.H., Holt,I., Eidhammer,I., Jonassen,I., Vanaken,S., Utterback,T., Feldblyum,T.V., Fraser,C.M., Lillehaug,J.R., és Eisen,J.A. (2004) Genomic insights into methanotrophy: The complete genome sequence of *Methylococcus capsulatus* (Bath). *Plos Biology* **2**: 1616-1628.

West,A.H. és Stock,A.M. (2001) Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems .*Trends in Biochemical Sciences* **26**: 369-376.

Whittenbury, R., DPhillips, K.C. és Wilkinson, J.F. (1970) Enrichment, isolation and some properties methane utilizing bacteria. *Journal of General Microbiology* **61**, 205-218.

Williams,E., Shimmin,M.A., és Bainbridge,B.W. (1977) Mutation in obligate methylotrophs *Methylococcus capsulatus* and *Methylomonas albus*. *FEMS Microbiology Letters* **2**: 293-296.

A dolgozat témájához kapcsolódó saját közlemények jegyzéke

Közlemények

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

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

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

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 Microbiological Letters* **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. (2000) Recent advances in biohydrogen research. *Pflügers Arch – Eur. J. Physiol.* **439**:81-83.

Kovács K.L, 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. (2000) Biohidrogén, Biogáz, Bioremediáció. *Acta Biologica Debrecina* Vol. 22

Poszter prezentációk

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

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

T.Hanczár, **R.Csáki**, L.Bodrossy, J.C.Murrell, K.L.Kovács (1999), Hydrogenases in methanotrophic bacteria. Magyar Mikrobiológiai Társaság kongresszusa.

T.Hanczár, **R.Csáki**, L.Bodrossy, J.C.Murrell, K.L.Kovács (2000) Hydrogen driven methane monooxygenase activities in *Methylococcus capsulatus* (Bath). 6th International Conference on the Molecular Biology of Hydrogenases, Berlin, Németország, aug. 5-10.

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

T.Hanczár, **R.Csáki**, J.Klem és K.L.Kovács. (2002) 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, július 5-12.

Előadások

Csáki R., Hanczár T., Klem J., Panmerr A. és Kovács L. K. (2001) A metán anyagcsere rézfüggő szabályozása metanotrófokban. Straub Napok, MTA SzBK, Szeged, Hungary, nov 25-30.

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

T.Hanczár, **Csáki R.**, Bodrossy L., Klem J., C.J. Murrell, Kovács L. K. (2001) Hidrogenázok metánfalókban, MTA SzBK, Szeged, Nov. 25-30.

T.Hanczár, **R.Csáki**, J.Klem, L.Bodrossy, J.C.Murrell, és K.L. Kovács. (2002) Molecular and biochemical studies of soluble methane monooxygenase and hydrogenases in *Methylococcus capsulatus* (Bath). Magyar Mikrobiológiai Társaság, Balatonfüred, Hungary, október 7-10.

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.

Hálás vagyok Dr. Fodor Barnának és Klem Józsefnek munkámhoz nyújtott önzetlen segítségükért és kiváló ötleteikért.

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

Summary

- I. I identified σ^N promoter like DNA sequence motifs in the 5' region of *mmoX*: the σ^N and the IHF (Integration Host Factor) binding site.
- II. I demonstrated that the DNA region between 358-280 bp in the 5' direction from the ATG codon of *mmoX*, just upstream from IHF binding site is indispensable for copper dependent sMMO expression.
- III. I determined the DNA sequence of a 9.5 kb long region downstream from *mmoC* (3' direction). In this region I identified *mmoG*, *mmoQ*, *mmoS* and *mmoR* genes.
- IV. I showed that in the *mmoXYBZCG* operon, containing the structural genes of sMMO, *mmoXY* and *mmoCG* intergenic regions have no promoter activity. It was suggested that all the structural genes: *mmoXYBZCG* are transcribed from the σ^N promoter in the 5' region of *mmoX* in *M. capsulatus* (Bath).
- V. I identified σ^{70} like promoter motifs in the 5' regions of *mmoS* and *mmoR*.
- VI. With bioinformatic tools I predicted the function of *mmoG*, *mmoQ*, *mmoS* and *mmoR* genes based on amino acid sequence similarities: putative MMOG is a GroEL like chaperonin, putative MMOS domain structure is very similar to the sensor protein of the two-component sensor-regulator systems. Putative MMOQ resembles the regulator of two-component systems. the domain structure of the putative MMOR is identical to the σ^N -dependent transcriptional activators.
- VII. I designed and produced *M. capsulatus* (Bath) mutant strains that contains mutations in *mmoG*, *mmoQ*, *mmoS* and *mmoR* genes, respectively. I examined the growth rate, sMMO activity, the presence of the *mmoX* mRNA and the presence of the α , β and γ subunits of sMMO under copper-free and copper containing medium. I demonstrated that *mmoG* and *mmoR* are indispensable for sMMO expression under copper-free conditions.
- VIII. I demonstrated that the promoter in the 5' region of *mmoX* is constitutive in $\Delta mmoQ$ and $\Delta mmoS$ mutant strains. In 2 μ M copper containing medium $\Delta mmoQ$ and $\Delta mmoS$ strains showed sMMO activity but the wild type strain had no sMMO activity at all.
- IX. I showed that in 5 μ M containing medium $\Delta mmoQ$ and $\Delta mmoS$ did not express active sMMO. I demonstrated that although *mmoX* constitutively transcribed when the medium contained 5 μ M copper-sulphate, there were no detectable sMMO subunits. I suggested that copper inactivated sMMO molecules degraded quickly under these conditions.
- X. I developed a highly efficient transposon based mutagenesis system for *M. capsulatus* (Bath). This permits the positive selection of mutants in which single, random insertion has occurred. The transposon also tags the mutated genes, thus the identification and isolation of

the corresponding genomic region is simple. This is the first report on high frequency transposon mutagenesis in *M. capsulatus* (Bath), and should be useful to study various biological processes of *M. capsulatus* (Bath) and to uncover the function of uncharacterized genes.

- XI. I produced a transposon mutant library of *M. capsulatus* (Bath) and developed a screening method to detect sMMO deficient mutants. I isolated 77 sMMO deficient mutants. I determined the site of integration of the transposon in 5 mutant strains. Based on the complete genome sequence of *M. capsulatus* (Bath) I determined the flanking genes of the mutated gene. Since the mutated genes and operons are quite diverse I suggest that the copper dependent regulation of SMMO is a complex process in *M. capsulatus* (Bath).