

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Biológiai és Sportbiológiai Doktori Iskola

Omik- technológiák a *Saccharomonospora azurea* törzsnemesítési és termékfejlesztési törekvéseinek szolgálatában

PhD értekezés tézisei

Kovács-Valasek Andrea

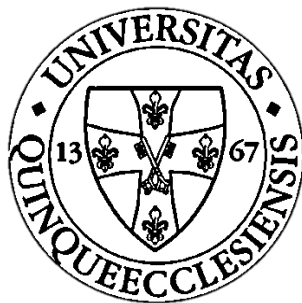
Témavezetők:

Dr. Fekete Csaba

Tanszékvezető egyetemi docens
Általános és Környezeti Mikrobiológiai Tanszék

Dr. Kerepesi Ildikó

Egyetemi docens
Genetikai és Molekuláris Biológiai Tanszék



PÉCS, 2016.

1. BEVEZETÉS

Napjainkban a biotechnológia és a bioinformatika szoros összefonódásának köszönhetően egy holisztikus szemléletmód térhódítása figyelhető meg a biológia területén. Az „omik”-technológiák – többek között genomika, transzkriptomika és proteomika – nyújtotta nagy-áteresztőképességű vizsgálatok nagyszámú gén, illetve fehérje egyidejű analízisét, ezen keresztül a sejtek, szövetek, szervezetek rendszerszerű működésének megismerését teszik lehetővé (Sang, Y. L. és mts., 2005, *Trends Biotechnol.*, **23**:349–358.).

A szemléletváltás az antibiotikum kutatás területén is új távlatokat nyitott. A technológia egyrészt magával hozta a kémiai genomika kibontakozását, ami lehetővé teszi a kisméretű molekulák terápiás alkalmazhatóságának mélyreható vizsgálatait. Emellett a random mutagenézis és az azt követő magas antibiotikum termelést mutató szervezetek szkrínelésének kombinált eljárásán alapuló klasszikus mikrobiális törzsnemesítés metodikáját is fokozatosan kezdi felváltani egy költséghatékonyabb és időtakarékosabb genomikai alapokon nyugvó megközelítés (Chaudhary, A. K. és mts., 2013, *Biomed Res. Int.*, **2013**:968518.).

Az ismert teljes örökítőanyag szekvenciával rendelkező mikroorganizmusok számának robbanásszerű növekedése nyilvánvalóvá tette, hogy a másodlagos metabolit termelő képességüket jócskán alábecsülték. A genom szekvenálásokból származó óriási adatmennyiség korábban nem ismert, kriptikus bioszintetikus génklaszterek jelenlétét tárta fel. Ugyanakkor számos a klinikumban sikerrel alkalmazott, klasszikus fermentációs eljárás során izolált terápiás szer fő hatóanyagáról bebizonyosodott, hogy az ún. tiotemplát szintézis útvonalon képződik (Du, L. és mts., 2001, *Metab. Eng.*, **3**:78-95.), amely elnevezés magában foglalja többek között a poliketid-szintézis (PKS), a nem-riboszomális peptidszintézis (NRPS) és ezen útvonalak kombinációiból létrejövő hibrid útvonalakat is (Hutchinson, C. R., 2003, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **100**:3010–2.). A tiotemplát génklaszterek moduláris szerveződése a genetikai mérnökség eszközeinek alkalmazásával lehetőséget nyújt „plug-and-play” módon az egyes modulok vagy akár domének átrendezésére, ezáltal jelent kiaknázhatatlannak tűnő biztosítékot új biológiailag aktív termék(ek) előállítására (Bode, H. B. és mts., 2005, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, **44**:6828–6846.).

Az „omik”-technológiákra alapozott törzsnemesítés kiindulópontját a bioaktív másodlagos anyagcseretermékek szintézisében érintett génszakaszok átfogó strukturális genomikai jellemzése jelenti. Az így nyert információk elengedhetetlenek a génklaszter kombinatorikai módosításának megtervezéséhez és kivitelezéséhez, mely révén a multienzim komplexről származtatható szubsztrátok száma jelentős mértékben megnövelhetővé válik. A szekunder metabolit szintézisében eltérő aktivitást mutató törzsek proteomikai összehasonlítása a termelés háttérében álló biológiai következtetések

levonását szolgálják azáltal, hogy mélyebb betekintést engednek az anyagcsereutak hálózatának és szabályozásának folyamataiba (Chaudhary, A. K. és mts., 2013, *Biomed Res. Int.*, **2013**:968518.).

A PTE TTK Általános és Környezeti Mikrobiológiai Tanszék valamint a Pannonpharma Kft. együttműködésének keretében megvalósult kutatási program nyújtott lehetőséget az itt bemutatott doktori dolgozat megírásához, mely során az első magyar antibiotikumként ismerté vált primycin termelésére mind a mai napig használt ipari baktérium törzs, a *Saccharomonospora azurea* SZMC 14600 modern technológiák alkalmazásával megvalósuló vizsgálatait végeztük el.

2. CÉLKITŰZÉSEK

- A *Saccharomonospora azurea* SZMC 14600 „*de novo*” genomszekvenálása új-generációs szekvenáló platformok előnyeinek ötvözésével és a genom általános sajátosságainak jellemzése.
- A *Saccharomonospora* taxon összehasonlító genomikai vizsgálatai.
- A genomban fellelhető NRPS és NRPS/PKS génklaszterek *in silico* strukturális jellemzése.
 - A multienzim-komplexekeket felépítő enzimikus domének azonosítása.
 - Az *in silico* prediktált domének aktív centrumának meghatározása.
 - Konzervált motívumok azonosítása a domének szekvenciájában.
- A *Saccharomonospora azurea* SZMC 14600 és DSM 44631 törzsek fehérjeizolálásának és SDS-PAGE elválasztásának optimalizálása.
- Az eltérő tápközegeken tenyésztett (nem-induktív: Luria-Bertani; induktív: előfermentációs (PF) és a főfermentációs (MF)) *Saccharomonospora azurea* SZMC 14600 és DSM 44631 teljes fehérjetartalmának összehasonlító kétdimenziós-gélelektroforézise.
- Az eltérést mutató fehérjék MALDI-TOF/TOF tömegspektrometriai azonosítása.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1 Mikroorganizmusok tenyésztése

Az alkalmazott mikroorganizmusok (*Saccharomonospora azurea* SZMC 14600; *Saccharomonospora azurea* DSM 44631; *Saccharomonospora viridis* DSM 43017; *Saccharomonospora glauca* DSM 43769; *Saccharomonospora cyanea* DSM 44106) általános fenntartásához LB médiumot használtunk. A bioaktív metabolit termelés indukálása többlépcsős termelési folyamat során valósult meg, folyékony és szilárd tápközeg egyidejű alkalmazásával. A termeltetési folyamatot a baktérium törzs fagyasztott letétjével indítottuk LB tápközegben, melyet az előfermentációs (PF), majd főfermentációs (MF) tápközegbe oltás követett.

3.2 Genomikai vizsgálatok

3.2.1 DNS izolálás

A DNS izolálását Sambrook és munkatársai Molecular Cloning Manual (Sambrook és mts., 2001, *Cold Spring Harb. Lab. Press*) genomi DNS izoláló módszerének adaptálásával végeztük kiindulásként 100-200 mg nedves sejttömeget alkalmazva. A minták mennyiségi és minőségi meghatározását NanoDrop 2000 UV-Vis spektrofotométerrel (Thermo Scientific) és Agilent 2100 Bioanalyzer DNS kittel végeztük.

3.2.2 „De novo” genomszekvenálás

A *Saccharomonospora azurea* 14600 törzs esetében izolált nagy mennyiségű és tisztaságú gDNS nukleotidsorrendjét. SOLiD 3 Plus (Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection) és Roche 454 FLX szekvenáló rendszerek segítségével határoztuk meg a szegedi BayGen Intézetben. A szekvenáláshoz a SOLiD 3 Plus rendszer esetében 25 bp hosszúságú adapterekkel ellátott mate-paired könyvtárat, illetve 50 bp-os fragment könyvtárat, míg a Roche 454 FLX rendszer esetében 400 bp hosszúságú könyvtárat készítettünk. A szekvenálásból származó adatok minőségi szűrését követően, a kapott fragmentek elemzésében és grafikus megjelenítésében a Genomics Workbench 4.8 (CLC Bio) volt segítségünkre. A genomok annotálása az NCBI (National Center for Biotechnology Information) Prokaryotic Genomes Automatic Annotation Pipeline (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/static/Pipeline.html>), EMBL EBI Velvet program valamint a RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology) szerver felhasználásával történt.

3.2.3 Összehasonlító genomanalízis

Összehasonlító genomikai vizsgálatokat az Integrated Microbial Genomes Database Expert Review (IMG-ER) szoftver (Markowitz, V. M. és mts., 2009, *Bioinformatics*, **25**:2271–8) használatára alapoztuk.

3.2.4 NRPS és PKS/NRPS hibrid domének strukturális genomikai jellemzése

A *Saccharomonospora azurea* SZMC 14600 genomban kódolt NRPS és PKS/NRPS hibrid génklaszterek azonosításához a CLUSTSCAN (Starcevic, A. és mts., 2008, *Nucleic Acids Res.*, **36**:6882–92.) és antiSMASH (Blin, K. és mts., 2013, *Nucleic Acids Res.*, **41**:W204–12.) programcsomagot használtuk. A feltárt génklaszterekben annotált gének és fehérjék homológia keresését az NCBI BLAST szerveren (Altschul, S. F. és mts., 1990, *J. Mol. Biol.*, **215**:403–10.) végeztük el. Az enzimikus domének részletes azonosításához és analíziséhez SMART (Letunic, I. és mts., 2012, *Nucleic Acids Res.*, **40**:D302–5.), MAPSI (Tae, H. és mts., 2009, *Bioprocess Biosyst. Eng.*, **32**:723–7.), SBSPKS (Anand, S. és mts., 2010, *Nucleic Acids Res.*, **38**:W487–96.), PKS/NRPS Analysis-Website (Bachmann, B. O. és mts., 2009, Chapter 8. *Elsevier Inc.*) és MEME (Bailey, T. L. és mts., 2009, *Nucleic Acids Res.*, **37**:W202–8.) programokat alkalmaztuk. A szekvenciák többszörös illesztését CLUSTALW program (Larkin, M. A. és mts., 2007, *Bioinformatics*, **23**:2947–8.) használatával hajtottuk végre. A fehérjék transzmembrán motívumainak felderítése érdekében TMHMM Server v. 2.0 (Möller, S. és mts., 2001, *Bioinformatics*, **17**:646–53.) használtuk.

3.3 Proteomikai vizsgálatok

3.3.1 Fehérje izolálás és koncentráció meghatározás

A fehérje izolálás céljából történő mintavételezés minden esetben a tenyésztési/termeltetési folyamatok (LB, PF, MF) végén történt. A proteomikai vizsgálatokhoz az X-Press készülék használatán alapuló, egy mikroyöngyös (Sánchez, I. és mts., 2003, *Int. J. Food Microbiol.*, **82**:181–189.), egy fagyasztás és felolvasztást alkalmazó (Kajiwara, H. és mts., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **67**:2668–2673.), valamint TCA/acetone és fenol (Wang, W. és mts., 2006, *Electrophoresis*, **27**:2782–6.) kombinált módszerek adaptálását végeztük el. A minták fehérje koncentrációját Nanodrop 2000 UV-Vis spektrofotométer segítségével UV280 nm-en; Bradford mikro módszer alkalmazásával 595nm-en, valamint Agilent Bioanalyzer 2100 készülék High Sensitivity Protein chip használatával mértük.

3.3.2 Egydimenziós gélelektroforézis (SDS- PAGE)

Az SDS-poliakrilamid gélelektroforézist (Laemmli, U. K., 1970, *Nature*, **227**:680–5.) a Biorad Miniprotean Tetra Cell készülék használatával végeztük. A gélek festése Coomassie Brilliant Blue festékoldattal történt. A gélképek dokumentációjához a FluorChemQ – Protein Simple készüléket használtuk.

3.3.3 Kétdimenziós-gélelektroforézis (O’Farrell-féle)

Az első dimenzióban a Ready IPG Strip pH 3-10 tartományú 7 cm hosszúságú stripjeit (BioRad) alkalmaztuk. A rehidratált fehérjemintákat a BioRad PROTEAN izoelektromos fókuszáló készülék

(PROTEAN IEF) gyári beállításai szerint fókuszáltuk. A második dimenziót megelőzően a stripeket két lépésben ekvilibráltuk. A második dimenzióban a fehérjéket 12,5%-os SDS-PAGE gélben szeparáltuk 120 V feszültségen a BioRad Mini Protean Tetra Cell rendszerében. A géldokumentációt a FluorChemQ – Protein Simple készülékkel végeztük. A minták összehasonlító proteomikai analízisére a Prodigy Software-t használtuk. A vizsgálatba bevont törzsek genomszekvenciái alapján virtuális proteinprofilot hoztunk létre a JVirGel szoftvercsomag (Hiller, K., 2003, *Nucleic Acids Res.*, **31**:3862–3865.) használatával.

3.3.4 Tömegspektrometria

3.3.4.1 Gélben történő emésztés

A gélben tripszinnel emésztett fehérje foltokat Sevchenko és munkatársai (*Nat. Protoc.*, 2006, **1**:2856–60.) által kidolgozott protokoll szerint koncentráltuk, illetve sóalanítottuk.

3.3.4.2 MALDI TOF/TOF MS vizsgálat

A mérésekhez 1 kHz Smartbeam-II szilárd fázisú lézerrel felszerelt Autoflex speed TOF/TOF (Bruker Daltonics) típusú tömegspektrométert használtunk. A peptidtömegeket MSDB, Swiss-Prot, NCBI-n és a *Saccharomonospora azurea* genomszekvenálásából származó proteom adatbázisban kerestettük Mascot PMF kereső szerver, Bruker BioTools 3.0 szoftver, illetve ProteinScape szerver 2.1 segítségével.

4. EREDMÉNYEK

4.1 A „de novo” genomszekvenálás – *Saccharomonospora azurea* SZMC 14600 genom általános jellemzői

A *Saccharomonospora azurea* SZMC 14600 örökítőanyag meghatározását két eltérő stratégiát alkalmazó új-generációs szekvenáló platform előnyeinek ötvözésével végeztük. A SOLiD 3 Plus rendszeren első ízben végrehajtott szekvenálás során 2×25 bp hosszúságú leolvasási keretméretet alkalmaztunk, melynek köszönhetően a genomot 8022 kontigba építettük. A kontigok nagyobb hatékonyságú összeépítése érdekében megduplázott leolvasási keret alkalmazásával (50 bp) újra elvégeztük a genom szekvenálását, azonban a kontigszámot nem tudtuk elfogadható szintre csökkenteni, ezért a hosszabb leolvasási kerettel dolgozó (~400-500 bp) Roche 454FLX rendszeren újabb futást hajtottunk végre. Az újonnan létrehozott, ~600 kontig ismételt bioinformatikai analízisével (az átfedő DNS szakaszok összehasonlítása, a redundáns szekvenciák kiszűrése) 255 konszenzus kontigot hoztunk létre. A Roche 454FLX konszenzus kontigjainak minőségét a SOLiD rövid, de megbízható szekvenciáival javítva a kontigok számát végül 255-ről 216-ra csökkentettük.

A „de novo” szekvencia adatok bioinformatikai analízise alapján elmondhatjuk, hogy a *S. azurea* SZMC 14600 törzs genomja 70,3 %-os GC tartalma alapján a magas GC tartalmú Gram-pozitív

aktinobaktériumok csoportjába tartozik. A bioinformatikai adatok feldolgozása során 4554 kódoló szekvenciát, 47 tRNS és 3 rRNS lókuszt sikerült azonosítani.

4.2 Összehasonlító genomikai vizsgálatok

A közelmúltban a *Saccharomonospora* nemzetség több képviselőjének komplett örökítőanyag szekvenciája vált publikussá. Korábbi biológiai értékmérés teszt és HPLC vizsgálatok a *Saccharomonospora azurea* SZMC 14600 magas és lényegesen alacsonyabb DSM 44631 bioaktív metabolit (primycin) termelőképességét állapították meg. A *S. viridis*, *S. glauca*, *S. cyanea* nem rendelkeznek ezen szekunder metabolit előállításának képességével.

Annak érdekében, hogy betekintést nyerjünk a másodlagos anyagcseretermékek bioszintéziséért felelős génklaszterek, valamint a szintézisre ható szabályozó gének szerkezeti és funkcionális viszonyaiba a *Saccharomonospora* nemzetség öt törzsének főbb genomikai ismérveit hasonlítottuk össze az Integrated Microbial Genomes (IMG) rendszer platformját használva. A fehérjét kódoló géneket COG abundancia profil mátrixba rendeztünk, melyet a génszámok szerint normalizáltunk. Az 5 szervezeten coregenomja és az egy-egy törzshez specifikus pangenomok megállapítása mellett meghatároztuk és kigyűjtöttük a kizárólag a *Saccharomonospora* nemzetség bioaktív metabolit termeléssel (primycin) bíró törzseinek, a *Saccharomonospora azurea* SZMC 14600 és DSM 44631 közös génszettjét, illetve a magas bioaktív metabolit termeléssel bíró *Saccharomonospora azurea* SZMC 14600 törzs-specifikus génlistáját is. A szekunder metabolit termelés szempontjából relevanciával bíró génszett-listák számos *Streptomyces* törzsekben már jól jellemzett, bioaktív anyagcsere termeléssel kapcsolatba hozható homológ fehérjét kódoló gént tartalmaznak, mint például az aszparagin szintáz A (Acc. EHK89311) vagy a metilaszpartát mutáz A (Acc. EHK89309, EHK89310).

4.3 NRPS és PKS/NRPS hibrid domének strukturális genomikai jellemzése

A *S. azurea* SZMC 14600 törzs genomszekvenálási projektje még ugyan nem zárult le, de az eddig rendelkezésünkre álló szekvenciális adatok is lehetőséget nyújtottak arra, hogy *in silico* a szervezet által termelt vagy potenciálisan termelhető szekunder metabolitok spektrumát feltérképezzük. Az AntiSmash programcsomag használatával az AHXB01000216 kontigon (70636 bp-től 183487 bp-ig) I-típusú moduláris poliketid szintáz (PKS), az AHXB01000041 kontigon egy 65,6 kb hosszúságú nemriboszomális peptid szintáz (NRPS) és az AHXB01000215 kontigon egy 37 annotált génből álló PKS-NRPS hibrid génklaszter meglétét igazoltuk, mely génklaszterek az antibiotikum termelés szempontjából kiemelt jelentőséggel bíró tiotemplát szintáz képviselői. Az AHXB01000041 kontigon azonosított NRPS szintáz génklasztert 'san'-nak neveztük el, míg az AHXB01000215 kontigon lévő PKS-NRPS hibrid génklasztert 'sah'-nak. A nukleinsav sorrend és a termékszerkezet között fennálló kolinearitás elve alapján meghatároztuk az egyes génklaszterek feltételezhető módosításoktól mentes

szénvázainak szerkezetét. Az enzimikus domének részletes bioinformatikai vizsgálataival feltártuk azok aktív centrumát és konzervált motívumait: így például a magas homológiát mutató NRPS és PKS tiolációs domének (PCP, ACP domének) jellegzetes konzervált motívumát (LGG{HD}S), vagy a termék leválasztásáért felelős tioészteráz domént, melyet csupán a san génklaszter esetében azonosítottunk. Az NRPS génklaszterekre jellemző kondenzációs doméneknek nemcsak a karakterisztikus motívumát vizsgáltuk, hanem funkcionális alcsoportba sorolását is elvégeztük, ezáltal igazolva a san génklaszter első kondenzációs moduljának starter jellegét. Hasonlóan jártunk el a PKS génklaszterek KR doménjei esetében, melyeket sztereokémiai jellemzőik szerint csoportosítottunk.

4.4 Proteomikai vizsgálatok

4.4.1 Fehérjeizolálás és detektálás

Annak érdekében, hogy a proteomikai vizsgálatok számára megfelelő sejtfeltárási és izolálási metodikát találjunk négy független módszer - X-Press, mikrogyöngyös feltárás; fagyasztás és felolvasztás; triklór-ecetsav/aceton és fenol kombinált módszer - hatékonyságát teszteltük fehérjetartalom meghatározás és 1D SDS-PAGE alkalmazásával. A gélek elemzése alapján az X-Press készülék használatán alapuló metodika, illetve a TCA/aceton/fenolos feltárás mutatkozott a leghatékonyabbnak. További munkáinkhoz utóbbi módszer használata mellett döntöttünk.

4.4.2 Kétdimenziós-gélelektroforézis (O'Farrell-féle)

Az intraspecifikus *Saccharomonospora* törzsek (*S. azurea* SZMC 14600, *S. azurea* DSM 44631) nem induktív (LB) és induktív (PF, MF) tápközegről származó fehérje extraktumait kétdimenziós-gélelektroforézis technika alkalmazásával hasonlítottunk össze. A fehérjeprofílok eloszlása főként a 15-150 kDa molekulatömeg és 4–7 izoelektromos pont tartományba esik, míg a magasabb pH tartományban markáns fehérje foltok jelenlétét detektáltuk, azonban ezek száma lényegesen alacsonyabb. Adataink, kísérleti módszereink helyességét igazolja, hogy a JVirGel 2.0 szoftver alkalmazásával generált virtuális gélképek nagy megbízhatósággal fedésbe hozhatóak voltak.

4.4.3 Tömegspektrometria

A *S. azurea* SZMC 14600 törzs MF indukáló tápközegről származó fehérje extraktumának kétdimenziós-gélelektroforézise során nyert gélképet a *S. azurea* DSM 44631 törzs azonos körülmények közül származó proteinprofiljával összevetve számos eltérést mutató fehérje foltot azonosítottunk. Mindezidáig összesen 4 folt tömegspektrometriai vizsgálatát végeztük el. A fehérjék ún. „peptid ujjlenyomatát (peptide mass fingerprint)” a Matrix Science adatbázis MASCOT programjával a *S. azurea* SZMC 14600 genomszekvenciája alapján prediktált fehérjék összességéből létrehozott teljes proteom adatbázissal történő összevetés két hipotetikus fehérjét, egy nukleozid difoszfat kináz-regulátort és egy HicB-család fehérjét azonosított.

5. AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

- A *Saccharomonospora azurea* SZMC 14600 törzs komplett genom szekvenálási programjának keretében a szervezet örökítőanyagát 216 kontigba rendeztük.
 - o Az annotált géneket a funkcionális Clusters of Orthologous Groups (COG) csoportokba soroltuk.
- COG adatbázis kategorizálási metodikájára alapozva az Integrated Microbial Genome (IMG) adatbázis alkalmazásával öt törzs összehasonlító genomelemzését végeztük el.
- Bioinformatikai eszközök segítségével strukturális genomikai szempontból jellemeztük a nem-riboszomális peptid szintáz (NRPS) és hibrid poliketid-nem-riboszomális peptid szintáz (PKS-NRPS) homológ szekvenciákat hordozó kontigok moduláris szerveződését és domén-strukturáját.
 - o Meghatároztuk az *in silico* prediktált domének szekvenciájában magasan konzervált motívumokat és azonosítottuk a domének aktív centrumát.
 - o Prediktáltuk a termékek poszt szintetikus módosításoktól mentes, oldalláncok nélküli szénvázainak szerkezetét.
- A fehérje izolálás optimalizálásaként megállapítottuk, hogy az X-Press és a TCA/aceton/fenol módszer alkalmas az 1-D és 2-D SDS PAGE vizsgálatokhoz szükséges fehérjekivonatok elkészítéséhez.
- Megkezdtük az eltérő primycin termelőképeségű *S. azurea* fajok összehasonlító proteomikai vizsgálatát.
- Azonosítottunk négy olyan fehérjét (HicB protein, nukleozid difoszfát kináz regulátor és 2 hipotetikus fehérje), melyeknek szerepe lehet a primycin termeléshez kapcsolódó másodlagos anyagcsere folyamatokban.

6. IRODALOMJEGYZÉK

- Sang, Y. L., Lee, D. Y., Tae, Y. K. (2005) Systems biotechnology for strain improvement. *Trends Biotechnol.*, **23**:349–358.
- Chaudhary, A. K., Dhakal, D., Sohng, J. K. (2013) An insight into the ‘-omics’ based engineering of streptomycetes for secondary metabolite overproduction. *Biomed Res. Int.*, **2013**:968518.
- Du, L., Sánchez, C., Shen, B. (2001) REVIEW Hybrid Peptide Polyketide Natural Products: Biosynthesis and Prospects toward Engineering Novel Molecules. *Metab. Eng.*, **3**:78-95.
- Hutchinson, C. R. (2003) Polyketide and non-ribosomal peptide synthases: falling together by coming apart. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **100**:3010–2.
- Bode, H. B., Müller, R. (2005) The impact of bacterial genomics on natural product research. *Angew. Chemie - Int. Ed.*, **44**:6828–6846.
- Sambrook, J., W Russell, D. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harb. Lab. Press. Cold Spring Harb. NY.*
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/static/Pipeline.html>
- Markowitz, V. M., Mavromatis, K., Ivanova, N. N., Chen, I. M., Chu, K., Kyrpides, N. C. (2009) IMG ER: a system for microbial genome annotation expert review and curation. *Bioinformatics*, **25**:2271–8.
- Starcevic, A., Zucko, J., Simunkovic, J., Long, P. F., Cullum, J., Hranueli, D. (2008) ClustScan: an integrated program package for the semi-automatic annotation of modular biosynthetic gene clusters and *in silico* prediction of novel chemical structures. *Nucleic Acids Res.*, **36**:6882–92.
- Blin, K., Medema, M. H., Kazempour, D., Fischbach, M. A., Breitling, R., Takano, E., Weber, T. (2013) antiSMASH 2.0-a versatile platform for genome mining of secondary metabolite producers. *Nucleic Acids Res.*, **41**:W204–12.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, **215**:403–10.
- Letunic, I., Doerks, T., Bork, P. (2012) SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource. *Nucleic Acids Res.*, **40**:D302–5.
- Tae, H., Sohng, J. K., Park, K. (2009) MapsiDB: an integrated web database for type I polyketide synthases. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, **32**:723–7.
- Anand, S., Prasad, M. V. R., Yadav, G., Kumar, N., Shehara, J., Ansari, M. Z., Mohanty, D. (2010) SBSPKS: structure based sequence analysis of polyketide synthases. *Nucleic Acids Res.*, **38**:W487–96.
- Bachmann, B. O., Ravel, J. (2009) Chapter 8. Methods for *in silico* prediction of microbial polyketide and nonribosomal peptide biosynthetic pathways from DNA sequence data. 1st ed. Elsevier Inc.
- Bailey, T. L., Boden, M., Buske, F. A, Frith, M., Grant, C. E., Clementi, L., Ren, J., Li, W. W., Noble, W. S. (2009) MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Res.*, **37**:W202–8.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J., Higgins, D. G. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, **23**:2947–8.

- Möller, S., Croning, M. D., Apweiler, R. (2001) Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions. *Bioinformatics*, **17**:646–53.
- Sánchez, I., Seseña, S., Palop, L. (2003) Identification of lactic acid bacteria from spontaneous fermentation of ‘Almagro’ eggplants by SDS-PAGE whole cell protein fingerprinting. *Int. J. Food Microbiol.*, **82**:181–189.
- Kajiwarra, H., Kaneko, T., Ishizaka, M., Tajima, S., Kouchi, H. (2003) Protein profile of symbiotic bacteria *Mesorhizobium loti* MAFF303099 in mid-growth phase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **67**:2668–2673.
- Wang, W., Vignani, R., Scali, M., Cresti, M. (2006) A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis. *Electrophoresis*, **27**:2782–6.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**:680–5.
- Hiller, K., Schobert, M., Hundertmark, C., Jahn, D., Münch, R. (2003) JVirGel: Calculation of virtual two-dimensional protein gels. *Nucleic Acids Res.*, **31**:3862–3865.
- Shevchenko, A. et al. (2006) In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat. Protoc.*, **1**:2856–60.

7. PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK

A disszertáció alapjául szolgáló tudományos közlemények:

Csepregi K., Valasek A., Péntes A., Tóth Z., Kiss E. Í., Kerepesi I., Horváth B., Nagy I., Fekete C.: Draft Genome Sequence of an Efficient Antibiotic-Producing Industrial Strain of *Saccharomonospora azurea*, SZMC 14600. *J Bacteriol.* 2012 Mar; **194**(5):1263.

Valasek A., Kiss Í., Fodor I., Kovács M., Urbán P., Jámor É., Fekete Cs., Kerepesi I.: Proteomic insight into the primycin fermentation process of *Saccharomonospora azurea*. *Acta Biol. Hung.* 2016.

A disszertáció alapjául szolgáló konferencia előadások és poszterek:

Valasek A., Csepregi K., Juhász Á., Frey B., Horváth B., Nagy I., Fekete Cs.: „A nem-riboszomális peptid szintáz (NRPS) génklaszter strukturális analízise egy antibiotikum termelő ipari baktérium törzsben” IX. Magyar Genetikai Kongresszus és XVI. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Pécs, 2011. március 25-27, poszter bemutatása.

Valasek A., Csepregi K., Tóth Zs., Kerepesi I., Frey B., Péntes Á., Juhász Á., Horváth B., Nagy I., Fekete Cs.: „In silico analysis of thio-template multidomain gene clusters in *Saccharomonospora azurea*” Szent Györgyi Konferencia, Szeged, 2012. március 22-25, poszter bemutatása.

Valasek A., Csepregi K., Tóth Zs., Kiss Í. É., Urbán P., Kerepesi I., Kukolya J., Horváth B., Nagy I., Fekete Cs.: „Genome-guided approach for identifying cryptic biosynthetic pathways and novel natural products in *Saccharomonospora azurea*” Hungarian Molecular Life Sciences 2013 Conference, Siófok, 2013. április 5-7.

Valasek A., Fodor I., Kiss Í. É., Kovács M., Tóth Zs., Urbán P., Jámor É., Márk L., Fekete Cs., Kerepesi I.: „From genomics to proteomics in the field of antibiotics research” Hungarian Molecular Life Sciences 2015 Conference, Eger, 2015. március 27-29. poszter bemutatása.

Egyéb tudományos közlemények:

Sáfrány E., Hobor R., Jakab L., Tarr T., Csöngői V., Járomi L., Sipeky Cs., Valasek A., Zeher M., Füst G., Czirják L., Melegh B.: Interleukin-23 receptor gene variants in Hungarian systemic lupus erythematosus patients. *Inflamm Res.* 2010 Feb; **59**(2):159-64.

Hadarits F., Kisfali P., Mohás M., Maász A., Sümegi K., Szabó M., Hetyésy K., Valasek A., Janicsek I., Wittmann I., Melegh B.: Stepwise positive association between APOA5 minor allele frequencies and increasing plasma triglyceride quartiles in random patients with hypertriglyceridemia of unclarified origin. *Pathol Oncol Res.* 2011 Mar; **17**(1):39-44.

Szabadfi K., Reglodi D., Szabo A., Szalontai B., Valasek A., Setalo Gy. Jr., Kiss P., Tamas A., Wilhelm M., Gabriel R.: Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide, A Potential Therapeutic Agent for Diabetic Retinopathy in Rats: Focus on the Vertical Information Processing Pathway. *Neurotox Res.* 2016 Apr; **29**(3): 432-446.

Egyéb konferencia előadások és poszterek:

Sáfrány E., Csöngői V., Járomi L., Magyar L., Maász A., Sipeky Cs., Valasek A., Zeher M., Melegh B.: „Interleukin-23 receptor (IL23R) polimorfizmusok vizsgálata szisztémás lupus erythematosusban szenvedő betegekben” Magyar Humán-genetikai Társaság VII. Kongresszusa, Pécs, 2008. július 11-13, poszter bemutatása.

Sáfrány E., Hobor R., Jakab L., Tarr T., Csöngői V., Járomi L., Sipeky Cs., Valasek A., Zeher M., Füst G., Czirják L., Melegh B.: „Interleukin-23 receptor (IL23R) polimorfizmusok vizsgálata Sjögren-szindrómás szenvedő betegekben” Magyar Humán-genetikai Társaság VII. Kongresszusa, Pécs, 2008. július 11-13, előadás.

Fekete Cs., Csepregi K., Valasek A., Juhász Á., Péntes Á., Péteri Zsanett, Kiss Í. É., Kiss E., Kondor B., Szabó L., Horváth B., Nagy I.: „Új generációs de novo szekvenálási stratégiák a bioaktív szekunder metabolitok megismerésének és kombinatórikai módosításának szolgálatában” IX. Magyar Genetikai Kongresszus és XVI. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Pécs, 2011. március 25-27, előadás.

Csepregi K., Valasek A., Juhász Á., Horváth B., Nagy I., Fekete Cs.: „A poliketid-szintáz (PKS) génklaszter strukturális analízise egy antibiotikum termelő ipari baktérium törzsben” IX. Magyar Genetikai Kongresszus és XVI. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Pécs, 2011. március 25-27, poszter bemutatása.

Csepregi K., Valasek A., Péntes Á., Tóth Zs., Kiss Í. É., Kerepesi I., Hunyadkürti J., Horváth B., Nagy I., Fekete Cs.: „Structural and functional characterization of polyketide synthase gene clusters found in newly sequenced bacterial genome” Szent Györgyi Konferencia, Szeged, 2012. március 22-25, poszter bemutatása.

Tóth Zs., Péntes Á., Pongrácz J., Hunyadkürti J., Valasek A., Horváth B., Nagy I., Fekete Cs.: „Whole transcriptome profiling of mono- and co-cultured two- and three dimensional in vitro liver models” Szent Györgyi Konferencia, Szeged, 2012. március 22-25, poszter bemutatása.

Tóth Zs., Péntes Á., Pongrácz E. J., Valasek A., Kiss Í. É., Urbán P., Fekete Cs.: „Toxicogenomic studies on two- and three dimensional in vitro liver model systems” II. Interdiszciplináris Doktorandusz Konferencia, Pécs, 2013. március 15., előadás bemutatása.

Urbán P., Brandt B., Major E., Jáger V., Kiss Í. É., Valasek A., Tóth Zs., Fekete Cs.: „A Mecsek-hegységéből származó kőzetek geomikrobiológiai jellemzése” III. Interdiszciplináris Doktorandusz Konferencia, Pécs, 2014. április 15-17, poszter bemutatása.

- Kiss Í. É., Valasek A., Tóth Zs., Urbán P., Fekete Cs.: „*NGS technológiára alapozott saját- és egyéb antibiotikum rezisztenciáért felelős gének azonosítása*” III. Interdiszciplináris Doktorandusz Konferencia, Pécs, 2014. április 15-17, poszter bemutatása.
- Nagy L., Tóth Zs., Kiss Í. É., Valasek A., Urbán P., Strasszer M., Kocsis B., Fekete Cs., Kilár F.: „*NGS based characterization of two Shigella sonnei strains with different LPS characteristics*” 30th International Symposium on Microscale Bioseparations, Pécs, 2014. április 27 - 2014. május 01.
- Nagy L., Tóth Zs., Kiss Í. É., Valasek A., Urbán P., Strasszer M., Kocsis B., Bihari Z., Fekete Cs., Kilár F.: „*Genetical Analysis of two Shigella sonnei Strains with Different LPS Characteristics*” 14th International Symposium and Summer School on Bioanalysis, Smolenice, 2014. június 28 - 2014. július 06.
- Nagy L., Tóth Zs., Kiss Í. É., Valasek A., Urbán P., Strasszer M., Kocsis B., Bihari Z., Fekete Cs., Kilár F.: „*Shigella analysis by NGS.*” ION Word Tour 2014, Budapest, 2014. szeptember 18.
- Kiss Í. É., Valasek A., Urbán P., Tóth Zs., Fekete Cs.: „*Mechanism of antibiotic self-resistance of primycin producing Saccharomonospora azurea strains*” Hungarian Molecular Life Sciences 2015 Conference, Eger, 2015. március 27-29. poszter bemutatása.
- Urbán P., Valasek A., Kiss Í. É., Tóth Zs., Bárándi G., Fekete Cs.: „*qPCR assay for measuring Trichoderma reesei peptaibol synthetase gene expression*” Hungarian Molecular Life Sciences 2015 Conference, Eger, 2015. március 27-29. poszter bemutatása.