

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Biológiai és Sportbiológiai Doktori Iskola

Genom, transzkriptom és fermentációs vizsgálatokra alapozott törzsnemesítés a primycin-bioszintézis hatékonyságának növelése céljából

PhD értekezés tézisei

Készítette: Kovács Márk

Témavezetők:

Dr. Fekete Csaba

Tanszékvezető egyetemi docens

Dr. Kemenesi Gábor

Egyetemi adjunktus



Pécs, 2021

BEVEZETÉS

Napjainkra a rezisztens baktériumok rohamos és egyre gyorsuló elterjedése világszerte komoly kihívások elé állítja az egészségügyi szakembereket. Az antibiotikumok túlzott mértékű és indokolatlan használata következtében mindinkább teret nyerő antimikrobiális rezisztencia (AMR) veszélyezteti a megbetegedések és elhalálozások jelentős hányadáért felelős patogén mikroorganizmusok okozta fertőzésekkel szembeni hatékony fellépést [1]. Az AMR folyamatos térhódítása az antimikrobiális gyógyszerkészítmények hatékonyságának fokozatos csökkenését vonja maga után, mely súlyos terheket ró a betegellátásra. Az Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization) évek óta próbálja felhívni a figyelmet a problémára. A legutóbbi 2019. évi jelentése szerint mintegy 700 ezer ember hal meg évente antibiotikum-rezisztens fertőzések következtében, köztük közel 230 000 a multidrog-rezisztens *Mycobacterium tuberculosis* okozta tuberkulózisban. Egyes becslések szerint a mikrobiális fertőzések okozta halálesetek száma megfelelő intézkedések nélkül akár 10 millióra is emelkedhet 2050-re [2].

Multidrog rezisztencia kialakulása során a mikroorganizmusok olyan szerkezetében vagy hatásmechanizmusában eltérő, több antimikrobiális készítménnyel szemben is rezisztensnek bizonyulnak, melyekkel szemben korábban érzékenyek voltak [3]. A legismertebb multidrog-rezisztens (MDR) kórházi patogének között számon tartott meticillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* (MRSA) hazánkban évi közel 900 regisztrált fertőzéssel az egyik legnagyobb esetszámú, multirezisztens kórokozó által okozott megbetegedésért felelős. Sikeressége kulcsa, hogy meticillin mellett sok esetben olyan általánosan alkalmazott antibiotikum csoportokkal szemben is rezisztensnek bizonyul, mint az aminoglikozidok, makrolidok, fluorokinolonok, klóramfenikol és tetraciklin, lényegesen megnehezítve az ellenük irányuló védekezést.

A helyzet komolyságát tovább erősíti, hogy az antibiotikumok penicillin felfedezésével kezdődő modern kora a 20. század derekán tapasztalt gyors felfutást követően a század végére komoly válságba jutott. A legújabb gyógyszeripari trendeket követve a gyártók fokozatosan a szintetikus vegyületkönyvtárak nagy áteresztőképességű szűrésére tértek át, mely jelentős mértékben visszavetette az új antibiotikumok felfedezésének mértékét. A tény, hogy az AMR kialakulása folyamatosan növekszik, mellyel párhuzamosan az új antimikrobiális ágensek után történő kutatások intenzitása csökken, szemléletváltást sürget a modernkori gyógyászatban.

A már régóta rendelkezésre álló antibiotikumainkkal kapcsolatos ismereteink mélyítése, valamint a korábban alkalmazott, de valamilyen okból perifériára szorult antibiotikumok ismételt bevezetése új alternatívát nyújthat az MDR patogénekkal szemben folytatott

küzdelemben [4]. Ezen koncepcióba kiválóan illeszkedik a hazánkban közel 70 éve felfedezett primycin [5]. A *Saccharomonospora azurea* faj képviselői által termelt nem polién típusú makrolid antibiotikum igazoltan fokozott antimikrobiális aktivitással rendelkezik számos gyakori Gram-pozitív kórokozóval szemben, beleértve több klinikai jelentőséggel bíró MDR törzset is. Ezen tulajdonságának, valamint a nem szaporodó baktériumokkal szemben megnyilvánuló baktericid hatásának köszönhetően a bakteriális patogének széles skálájával képes felvenni hatékonyan a versenyt [6]. Ugyan topikális készítmény formájában évtizedek óta sikeresen alkalmazzák Magyarországon, azonban formulációs problémák mindezülig nem tették lehetővé széleskörű felhasználását a klinikumban. Mindazonáltal alkalmazásában, kedvező antimikrobiális tulajdonságainak köszönhetően, komoly terápiás potenciál rejlik. A primycinnel kapcsolatos további lehetséges termékfejlesztést nagyban elősegítheti a primycin-termelő szervezetről és magáról az antibiotikum szintézis folyamatáról alkotott képünk bővítése.

Amellett, hogy az utóbbi években több kezdeményezés is indult az antibiotikum-kutatási és fejlesztési folyamatok élénkítése érdekében, a genom szinten történő elemzések alkalmazása klasszikus mikrobiológiai és analitikai módszerekkel párosulva egyáltalán nem jellemző folyamat ipari szinten. Ezen innovatív technológiákat alkalmazva célul tűztük ki a primycin-szintézis háttérben húzódó folyamatok mélyreható megismerését a termelő *S. azurea* törzsek összehasonlító strukturális és funkcionális elemzése révén, valamint a fermentációs eljárás hatékonyságának növelését, melyre a Pécsi Tudományegyetem Természettudományi Kar Általános és Környezeti Mikrobiológiai Tanszék és a PannonPharma Kft. szerepvállalásával megvalósult közös kutatási projekt biztosított lehetőséget.

CÉLKITŰZÉSEK

A bevezetőben elhangzott elveket szem előtt tartva munkánk során az alábbi célkitűzéseket fogalmaztuk meg:

- Primycin termelés potenciáljának feltárása a *Saccharomonospora* nemzetségen belül található rokon szervezetek átfogó összehasonlítása révén.
- A potenciálisan primycin-termelő szervezeteknek bizonyuló törzsek antibiotikumtermelő-képességének meghatározása klasszikus mikrobiológiai és analitikai módszerek segítségével.
- A primycin fermentációs eljárás hatékonyságának növelése hagyományos fermentáció optimalizáció révén.
 - Különböző minőségű zsírsav szubsztrátok fermentációs hozamra gyakorolt hatásának vizsgálata.
- A primycin bioszintézisért felelős génklaszter *in silico* strukturális jellemzése:
 - I-es típusú PKS struktúrgének, valamint a primycin molekula bioszintézisében résztvevő prekursor, illetve módosító gének azonosítása.
 - A primycin PKS modul és domén szerveződésének jellemzése.
 - A multienzim szubsztráthasznosításáért felelős katalitikus domének strukturális vizsgálata.
- A *S. azurea* SZMC 14600 és *S. azurea* DSM 44631 törzsek komparatív funkcionális analízise:
 - RNS szekvenálásából származó adatok bioinformatikai feldolgozása.
 - A differenciáltan expresszáldott gének funkcionális azonosítása és besorolása GO (Gene Ontology), illetve COG (Clusters of Orthologous Groups) rendszerek segítségével.
 - Az eltérő expressziót mutató gének vizsgálata kvantitatív valós idejű PCR-rel.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Mikroorganizmusok tenyésztése

A primycin termelő törzsek (*Amycolatopsis orientalis* DSM 40040, *Kibdelosporangium aridum* DSM 43828, *Saccharomonospora azurea* SZMC 14600 és *Saccharomonospora azurea* DSM 44631) antibiotikum termelésének indukálása többlépéses fermentációs eljárás során valósult meg. Ennek során a -80°C-on tárolt fagyasztott letétből kiindulva elsőként EI tápoldatba, majd EF tápoldatba oltottuk a termelő szervezeteket, majd primycin fermentáció körülmények között inkubáltuk.

Antimikrobiális hatás vizsgálat

A primycin antimikrobiális hatásának vizsgálatát agardiffúziós biológiai értékméréssel végeztük el ötnapos rázatott lombikos fermentlé mintákból [7]. A vizsgálatokhoz referencia standarként kristályos primycin-szulfát törzsoldatot használtuk. Az agardiffúziós biológiai értékmérésre MACA ferde agaron növesztett *Bacillus subtilis* ATCC 6633 tesztörzs 24 órás tenyészeteit használtuk. A gátlási zónák leolvasását mm pontossággal elvégeztük, a kapott értékeket átlagoltuk. A standard esetében ábrázoltuk a mért gátlási zónák nagyságát az ismert koncentrációk függvényében, majd a pontokra illesztett görbe egyenletébe behelyettesítve meghatároztuk a mintáknál mért gátlási zónákhoz tartozó koncentráció értékeket.

Nagy teljesítményű folyadékkromatográfia

A rázatott lombikos fermentációk különböző időpontjaiban megmintázott fermentlé minták primycin koncentrációjának meghatározását, az antimikrobiális hatás vizsgálatl párhuzamosan, nagy teljesítményű folyadékkromatográfiával (HPLC) kapcsolt elektropray ionizációs tömegspektrométerrel (ESI-MS) is elvégeztük. Vizsgálatainkhoz referencia standarként szintén kristályos primycin-szulfátot használtunk. A fermentlé extraktumok mérése során az feltételezett tömeg/töltés alapján történt a primycin komponensek egyértelmű beazonosítása. Minden kísérletet legalább három biológia és technikai ismétlésben végeztünk. Az eredmények statisztikai kiértékelését kéttényezős varianciaanalízissel (ANOVA) végeztük GraphPad Prism statisztikai szoftver segítségével.

DNS-DNS-hibridizáció

A *Saccharomonospora* fajok *in silico* DNS-DNS-hibridizációját (DDH) a Genome-To-Genome Distance Calculator (GGDC) web szerver (<https://ggdc.dsmz.de>) segítségével végeztük. A távolság értékek meghatározására a nem teljes, draft genomok összehasonlításához ajánlott 2-

es formulát („Formula 2”) használtuk [8]. A vizsgálatba bevont *Saccharomonospora* genomok génbanki hozzáférési száma: *S. azurea* SZMC 14600 - AHBX01000000; *S. azurea* DSM 44631 - AGIU02000000; *S. amisosensis* DSM 45685 - JAAOYM000000000; *S. cyanea* DSM 44103 - AHLY00000000; *S. glauca* DSM 43769 - AGJI00000000; *S. halophila* DSM 44411 - AICX00000000; *S. marina* DSM 45390 - AHLX01000000; *S. paurometabolica* DSM 44619 - AGIT02000000; *S. piscinae* 06168H-1 - VCEK01000000; *S. saliphila* DSM 45087 - AICY01000000; *S. viridis* DSM43017 - ABUM01000000; *S. xinjiangensis* DSM 44391 - AICV00000000.

Primycin bioszintézis génklaszter

A primycin bioszintézisért felelős génklaszter azonosítását az antiSMASH (Antibiotics & Secondary Metabolite Analysis Shell) [9] online szoftvercsomag segítségével végeztük el. A program által bioszintetikus struktúrgénként és a további bioszintetikus génként azonosított gének és fehérjék homológia keresését a National Center for Biotechnology Information (NCBI) szerver nem redundáns fehérje adatbázisban végeztük BLASTp segítségével [10].

Primycin PKS génklaszter azonosítása és in silico strukturális elemzése

A primycin PKS génklaszter azonosítása és további elemzése antiSMASH és SBSPKS (Structure Based Sequence Analysis of Polyketide Synthases) [11] online szoftverek, a katalitikus domének aminosav szekvenciájának többszörös illesztése CLUSTALW program segítségével történt [12]. Az adott primycin PKS domének aminosav szekvenciáinak illesztését amfotericin, azalomycin, eritromicin, rapamycin, stambomycin és thailandin PKS hasonló karakterisztikával bíró referencia szekvenciáival végeztük.

Az NCBI nem redundáns fehérje adatbázisban végzett homológia keresés eredményeképpen nagyfokú hasonlóságot mutató *K. aridum* és *A. orientalis* fajok képviselőire szintén kiterjesztettük a primycin-termelő *S. azurea* törzsek kapcsán elvégzett primycin PKS génklaszter *in silico* analízisét. A vizsgálatához felhasznált genomok génbanki hozzáférési száma: *K. aridum* DSM 43828 - FWXV00000000; *K. aridum* A82846 - QHKI00000000; *K. aridum subsp. largum* NRRL B-24462 - JNYM01000003; *A. orientalis* B-37 - JXRD01000000; *A. orientalis* DSM 40040 - ASJB00000000.

Transzkriptomika

A transzkriptomikai vizsgálatokhoz szükséges RNS izolálását ötnapos EF fermentlevekből végeztük. A minták RNS mennyiségének meghatározását Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific) fluorométeren Qubit™ RNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) segítségével, a minőségi

meghatározást pedig Agilent Bioanalyzer 2100 készüléken Agilent RNA 6000 Nano kit segítségével végeztük. Mindkét primycin-termelő *S. azurea* törzs esetében a több biológiai ismétlésből származó, nagy tisztaságú, azaz megfelelő RNS integritás (RIN) értékekkel (RIN >8,5) bíró RNS minták poolozásra kerültek. Egyesítést követően az RNS szekvenálást a szegedi BayGen Intézet SOLiD v4 szekvenáló rendszerével végeztük. A szekvenáláshoz SOLiD total RNA-Seq Kit-et (Thermo Fisher Scientific) használtunk a gyártói utasításnak megfelelően.

Bioinformatikai analízis

Az RNS szekvenálásból származó adatok analízisét a Galaxy szerver online platformján (<https://usegalaxy.org>) végeztük [13]. A *S. azurea* SZMC 14600 és *S. azurea* DSM 44631 transzkriptomikai „read”-ek illesztése a *S. azurea* SZMC 14600 referencia genomhoz történt Bowtie2 segítségével, míg a transzkriptom összeszerelést és differenciál expressziós vizsgálatokat a Cufflinks programcsomaggal hajtottuk végre [14]. A legalább kétszeres eltérést mutató (>2 vagy <-2 , \log_2), eltérően expresszáldott gének funkcionális annotációja Blast2GO (ver. 5.2.4.) szoftverrel történt [15]. A GO besorolást az NCBI szerver nem redundáns fehérje adatbázisban végeztük BLASTx segítségével, $10e-3$ „e-value” kimutatási küszöb mellett.

A differenciáltan expresszáldó gének (DEG) COG funkcionális csoportokba történő besorolását a Joint Genome Institute (JGI) Integrated Microbial Genomes & Microbiomes (IGM/M) rendszer alapján végeztük [16, 17].

Kvantitatív valós idejű PCR (qRT-PCR)

Az RNS szekvenálási eredmények validálását hét kiválasztott gén (EHK80158.1 - ABC transzporter ATP-kötő fehérje, EHK80159.1 - ABC-transzporter transzmembrán fehérje, EHK80176.1 - Kétkomponensű hisztidin kináz, EHK80172.1 - Agmatináz, EHK88153.1 - TetR/AcrR család transzkripcionális szabályozó, EHK84821.1 - 3-oxoacil-(acil-karrier-protein) szintáz III és EHK87608.1 - 3-oxoacil-(acil-karrier-protein) szintáz fehérjéket kódoló gén) expressziós analízisen keresztül végeztük el kvantitatív valós idejű PCR (qRT-PCR) segítségével ABI Prism 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems) készüléken. A vizsgálatok alapjául szolgáló *S. azurea* RNS mintákat független fermentációkból (biológiai ismétlések) származó fermentlevekből izoláltuk Quick-RNA MiniPrep (Zymo Research) kittel a gyártói utasításoknak megfelelően. Az izolált minták RNS mennyiségének meghatározását Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific) fluorométeren Qubit™ RNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) segítségével végeztük. Egy μg totál RNS-ből kiindulva RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific) segítségével végeztük a cDNS szintézist. A PCR

reakcióhoz Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix-et használtunk 25 μ L-es reakció térfogatban. A relatív génexpressziós értékeket $\Delta\Delta$ Ct módszerrel [18] határoztuk meg gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH) belső kontrollra vonatkoztatva. Minden biológiai mintát legalább három technikai ismétlésben vizsgáltunk. Az RNS-seq és az qRT-PCR eredmények közötti összefüggés kiszámítására Pearson-korrelációt alkalmaztunk.

EREDMÉNYEK

Primycintermelő-képesség

Munkánk során a primycintermelő-képesség meglétét vizsgáltuk a *Saccharomonospora* nemzetségbe tartozó fajok összehasonlító elemzése révén. Ugyan a PTE TTK Biológiai Intézet Általános és Környezeti Mikrobiológiai Tanszék korábbi munkássága során bizonyítást nyert, hogy a *S. azurea*-val legközelebbi rokonságot mutató *S. cyanea*, *S. glauca*, *S. xinjiangensis* és *S. viridis* fajok képviselői képesek primycin fermentációs körülmények között növekedésre és szaporodásra, azonban antibiotikum termelés esetükben nem volt kimutatható sem a klasszikus agardiffúziós biológiai értékméréssel, sem pedig a folyadékkromatográfiás analitikai módszerrel. A *Saccharomonospora* nemzetség genomszekvenálási adatainak átfogó elemzése során végzett *in silico* DNS-DNS-hibridizációs vizsgálataink eredményei jól szemléltetik a *S. azurea* egyedi szerepét a nemzetségen belül, mely genom szinten meglehetősen alacsony hasonlóságot mutat a rokon *Saccharomonospora* fajokkal. A genomszekvenálási adatainak mélyrehatóbb analízise során bizonyítást nyert, hogy a nemzetségen belül kizárólag a *S. azurea* rendelkezik a primycin bioszintéziséért felelős génkészlettel, mindazonáltal a *Pseudonocardiaceae* családon belül az *Amycolatopsis orientalis* és a *Kibdelosporangium aridum* fajok esetében szintén azonosítottunk olyan törzseket, melyek rendelkeznek a primycin bioszintézis génklaszterrel. Ez utóbbiak esetében azonban a primycin bioszintéziséért felelős struktúrgének megléte nem társul aktív antibiotikum szintézissel.

Annak ellenére, hogy az egyazon fajhoz tartozó, genetikailag közelálló *S. azurea* törzsek minden ismert képviselője alkalmas primycin termelésre, a primycin termelés hozamában jelentős különbségek figyelhetők meg. A primycintermelő-képességben mutatkozó eltérések, az általunk mélyrehatóbban vizsgált *S. azurea* DSM 44631 és *S. azurea* SZMC 14600 törzsek összevetésében akár 10x-es nagyságrendet is elérheti.

Zsírsav szubsztrátok primycin bioszintézisre gyakorolt hatása

A primycin fermentáció hatékonyságának növelését célzó kísérleteink során különböző zsírsav szubsztrátok primycin termelésre gyakorolt hatását vizsgáltuk. Vizsgálataink során HPLC/ESI-MS módszerrel igazoltuk, hogy ha a primycin fermentációs tápközegben eredendően 3 g/L koncentrációban jelenlévő sztearinsavat a *S. azurea* sejtekben domináns telített zsírsavra, azaz palmitinsavra (3 g/L) cseréljük, úgy szignifikánsan magasabb hozam érhető el. Bizonyítást nyert továbbá, hogy a primycin fermentációs tápoldathoz direktbe adagolt zsírsav szubsztrát mellett ugyancsak megtalálható napraforgóolaj szintén hatással van a fermentáció hozamára, melynek elhagyása csökkent primycin termelést eredményez.

Annak megválaszolására, hogy a fermentációs tápoldathoz adagolt különböző minőségű zsírsav szubsztrátok miként befolyásolják a primycin hozamot elvégeztük több gyakori zsírsav átfogó összehasonlító analízisét. Vizsgálataink értelmében a primycin termelés fokozására első sorban a hosszú szénláncosságú zsírsavak (palmitinsav, sztearinsav, laurinsav) bizonyultak hatékonyak, míg a rövid szénláncosságú zsírsavak (kapronsav, vajsav) által indukált hozam tőlük jelentősen elmaradva 450 mg/L alatt maradt. Ezzel szemben a közepes láncosságú zsírsavak (kaprinsav, önantsav) alkalmazása antibakteriális hatással bírtak a termelő szervezetre, így esetükben primycin termelést nem mértünk.

A legmagasabb primycin hozamot eredményező palmitinsav, sztearinsav és laurinsav koncentráció függő összevetéséből megállapítható, hogy palmitinsav bizonyult a leghatásosabb komponensnek minden egyes tesztelt zsírsav koncentráció (3 g/L, 4,5 g/L és 6 g/L) alkalmazása mellett függetlenül az eltelt időtől. Az elért maximális hozamokat tekintve mindhárom zsírsav esetében a 4,5 g/L-es kiindulási zsírsav koncentráció mellett mértük a legmagasabb primycin koncentrációkat (palmitinsav: 2177,19 mg/L, sztearinsav: 1388,87 mg/L-es, laurinsav: 1076,70 mg/L). Ugyan a kiindulási zsírsav koncentrációk összevetéséből látható, hogy az alkalmazott zsírsav típusától függetlenül a 4,5 g/L-es koncentráció volt a legkedvezőbb a primycin termelés szempontjából, azonban statisztikailag is igazolható szignifikáns különbség nem volt kimutatható a 3 g/L-es, illetve a 6 g/L-es koncentrációkhoz képest.

Deguanidino-amino-A1 és A1 primycin komponensek azonosítása HPLC/ESI-MS-sel

A HPLC/ESI-MS módszerrel történő primycin koncentráció meghatározással párhuzamosan vizsgáltuk az agmatináz enzim aktivitására utaló deguanidino-amino-A1 és A1 primycin komponensek jelenlétét a fermentlé extraktumokban. Az m/z értékek alapján mindkét primycin-termelő *S. azurea* törzs esetében egyértelműen sikerült azonosítanunk a deguanidino-amino-A1 és A1 (guanidino-A1) primycin molekulát is. Méréseink értelmében a totál primycin A1 (deguanidino-amino-A1 + A1) mennyiségének kevesebb, mint 10%-át teszi ki a deguanidino-amino-A1 primycin.

A primycin bioszintézis génklaszter jellemzése

A korábban hozzáférhetővé vált *S. azurea* SZMC 14600 draft genom adatok [19] újbóli elemzése során feltártuk és beazonosítottuk a komplett primycin bioszintetikus génklaszter, mely magába foglalja az I-es típusú PKS struktúrgéneket, továbbá a biológiailag aktív primycin molekula bioszintéziséhez nélkülözhetetlen prekursor, illetve módosító géneket. A primycin bioszintetikus génklaszterhez köthető gének és fehérjék NCBI adatbázisban lefuttatott

homológia keresése alapján a *K. aridum*, valamint *A. orientalis* fajok homológ fehérjéivel mutatták a legnagyobb fokú azonosságot.

Primycin PKS génklaszter azonosítása és in silico strukturális elemzése

A genomszekvenálási adatok módszeres revíziója során meghatároztuk a primycin bioszintézisért felelős PKS multienzim pontos szerkezeti felépítését. Minthogy a primycin bioszintézis génklaszter kapcsán lefuttatott homológia keresés nagyfokú hasonlóságot mutatott a *K. aridum*, valamint az *A. orientalis* fajok bioszintetikus génjeivel, így az NCBI adatbázisban hozzáférhető genomszekvenálási adatok felhasználásával elvégeztük ezen fajok átfogó, szekunder metabolizmushoz köthető bioszintetikus génjeinek analízisét. Ennek megfelelően a *K. aridum* DSM 43828, *K. aridum* A82846 és *K. aridum* subsp. *largum* NRRL B-24462, valamint az *A. orientalis* B-37 és *A. orientalis* DSM 40040 esetében sikerült teljes értékű, 18 modulból álló primycin PKS génklasztert azonosítanunk.

AT domén szubsztrátspecificitásának jellemzése

A primycin PKS enzimkomplexben fellelhető AT domének aminosav szekvenciáinak illesztése során 12 esetben malonil-KoA specificitással bíró AT doméneket azonosítottunk, melyek egyaránt hordozzák a jellemző GHSx[LVIFAM]G és HAFH konzervált szekvencia-motívumokat. Öt esetben metilmalonil-KoA szubsztrátspecificitás figyelhető meg a tipikus GHSx[QMI]G és YASH szekvencia-motívumokkal. Ezekről eltérően, nem szokványos szubsztrát specificitással bíró AT domént találtunk a 18. modulban, ahol a 88-92. pozícióban található GHSQG és 192-195. pozícióban található GAGH szekvenciamotívumok jelenléte butilmalonil-KoA, pentilmalonil-KoA vagy hexilmalonil-KoA beépülését vetíti előre.

KR domén jellemzése

Az aminosav szekvencia illesztéseket követően összesen 7 darab A1-típusú (2R, 3S) KR domént azonosítottunk a primycin PKS esetében, a 141-es pozícióban fellelhető, A-típusú ketoreduktázokra jellemző triptofán (W) alapján, míg 10 darab B1-típusú (2R, 3R) és 1 darab B2-típusú (2S, 3R) KR domént azonosítottunk a B-típusú KR-ra jellemző leucinből és két aszparaginsavból (LDD) álló szekvenciamotívum (94-96. pozícióban) alapján.

L-arginin prekursor szintézis útvonal

A primycin bioszintézis kiindulási egysége az L-arginin prekursor szintézis útvonalon keresztül szintetizálódó 4-guanidinobutanoil-KoA molekula. A többlépcsős szintézis folyamat során a

kiindulási L-arginin molekulából elsőként 4-guanidinobutiramid, majd 4-guanidinobutánsav és végül 4-guanidinobutanoil-KoA képződik, mely reakciókat *S. azurea* SZMC 14600 esetében az amin oxidáz (EHK88410.1), amidohidroláz (EHK88411.1) és acil-KoA ligáz (EHK88415.1) enzimek katalizálnak. A létrejött 4-guanidinobutanoil-KoA molekula végül az S-maloniltranszferáz (EHK80162.1) enzim közvetítésével kapcsolódik a primycin bioszintézist végző PKS multienzim első acil-karrier protein (ACP) doménjéhez.

Primycin szintézist módosító és szabályozó gének

A primycin PKS struktúrgének és L-arginin prekursor szintézis útvonalban résztvevő katalitikus enzimeket kódoló gének mellett a primycin molekula bioszintézisében résztvevő további 16 módosító, illetve szabályozó gén is azonosításra került, mely magas fokú homológiát mutat a *K. aridum* primycin PKS kapcsán jellemzett génekkel.

Funkcionális genomika

Annak érdekében, hogy minél részletesebb betekintést nyerjünk az alacsony termelőképességű és az emelt primycintermelő-képességgel rendelkező *S. azurea* törzsek génexpressziós szinten megnyilvánuló különbségeibe új generációs szekvenálásra alapozott transzkriptomikai analízist végeztünk. Ennek következtében összesen 330 differenciáltan expresszálódó gént (DEG) azonosítottunk *S. azurea* SZMC 14600 és 356-ot *S. azurea* DSM 44631 esetében. Előbbinél a 330 azonosított DEG-ből összesen 253 gén funkcionális annotációját és GO kategóriákba való besorolását végeztük el, míg utóbbinál a 356 DEG-ből 276 gén funkcionális annotációja és besorolása történt meg.

Szintén elvégeztük a gének prediktált funkció szerint történő osztályozását COG adatbázis alapján is, amely során 294 és 313 gént sikerült osztályoznunk 22 egyedi kategóriába. A primycin bioszintézishez potenciálisan köthető gének közül, a védelmi mechanizmusok (V) COG kategóriát képviselve, közvetlenül a primycin PKS génklaszter mellett azonosítottunk két ABC multidrog transzportert kódoló gént (EHK80158.1 és EHK80159.1), melyek 8,0 és 3,8 log₂ fold-change értékekkel overexpresszálódtak *S. azurea* SZMC 14600-ban. Hasonlóképpen a TetR család transzkripció szabályozói (TFR) között, melyek olyan változatos folyamatok szabályozásában vesznek részt, mint az antibiotikum termelés, efflux pumpák szabályozása, valamint multidrog- és self-rezisztencia, több gén is magasabb expressziós szinten nyilvánult meg (2,08 és 5,23 log₂ fold-change értékek között) az emelt primycintermelő-képességű törzsből.

Az aminosav transzport és metabolizmus (E) COG kategóriába sorolt agmatináz enzimet kódoló gén, mely közvetlenül a PKS génklaszter 3' pozíciójában helyezkedik el szintén upregulációt mutatott az emelt primycintermelő-képességgel rendelkező törzsben (2,62 log₂ fold-change).

Habár a primycin bioszintézis génklaszter komparatív analízise nem mutatott ki strukturális különbségeket a *S. azurea* SZMC 14600 és *S. azurea* DSM 44631 között, azonban a génklaszteren belül a kétkomponensű szignáltranszdukciós rendszert felépítő hisztidin kináz receptort (EHK80176.1) és a hozzákapcsolódó válasz szabályozót (EHK80177.1) kódoló gén is upregulálódott az emelt primycintermelő-képességű törzsben. Továbbá a leucin-fogékony szabályozó fehérje (EHK88701.1) szintén eltérő expressziót mutatott a vizsgált két törzs között.

Jól ismert tény, hogy a poliketid- és a zsírsavszintézis útvonalak szorosan kapcsolódó, közös evolúciós múltra vezethetők vissza. A magas szintű szerkezeti diverzitást mutató molekulák bioszintézise során a két megasztáz összeszerelési folyamataiban homológ domének vesznek részt, valamint olyan közös prekursor molekulákon osztoznak, mint az acetyl- és malonyl-KoA [20]. A zsírsavszintézis folyamatában kulcsszereppel bíró 3-oxoacil-(acil-karrier-protein) szintáz kódoló gének (EHK89245.1, EHK87608.1 és EHK84821.1) génexpressziós profilját vizsgálva megfigyelhető volt, hogy ezen géneket alacsonyabb expressziós szint jellemezte az emelt primycintermelő-képességű törzsben.

qRT-PCR vizsgálatok

Az RNS-szekvenálásból származó eredményeink validálását qRT-PCR vizsgálatokkal végeztük, melynek során hét, a primycin bioszintézishez potenciálisan köthető gén génexpressziós analízisét végeztük el. A kapott eredmények statisztikailag is megerősítik az RNS-szekvenálási adatok hitelességét, hiszen a qRT-PCR és az RNS-Seq mérési eredményeink jó összhangot mutatva 0,71-es korrelációs együtthatóval jellemezhetőek ($p < 0,05$). A log₂ transzformált génexpressziós értéket figyelembe véve a kétkomponensű hisztidin kináz, az ABC transzporter ATP-kötő fehérje, az ABC-transzporter transzmembrán fehérje, az agmatináz és a TetR/AcrR család transzkripcionális szabályozó kódolásáért felelős gének egyaránt overexpressziót mutattak az emelt primycintermelő-képességgel rendelkező *S. azurea* SZMC 14600 törzs esetében. Ezzel szemben a zsírsavszintézishez köthető 3-oxoacil-(acil-karrier-protein) szintáz III, 3-oxoacil-(acil-karrier-protein) szintáz enzimeket kódoló gének egyaránt downregulálódtak a *S. azurea* DSM 44631 törzshöz képest.

AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

Az újonnan, illetve ismételten felbukkanó mikrobiális kórokozók gyors evolúciós fejlődése és a klinikumban alkalmazott antibiotikumokkal szemben mutatott alkalmazkodó képessége nem csupán az új antimikrobiális szerek felfedezésére irányuló kutatások fontosságát emeli ki, hanem a már meglévő antibiotikumokkal kapcsolatos ismeretek elmélyítésének szükségességét is hangsúlyozza. Ebbe a koncepcióba kiválóan illeszkedik a hazánkban 1954-ben felfedezett primycin, melyben a Gram-pozitív baktériumokkal szemben mutatott kedvező antimikrobiális tulajdonságainak köszönhetően komoly terápiás potenciál rejlik.

Jelen tanulmány során multidiszciplináris megközelítést alkalmazva hagyományos mikrobiológiai, analitikai kémiai, illetve fejlett bioinformatikai eszközzel támogatott strukturális, funkcionális és összehasonlító genomikai eljárások segítségével célként fogalmaztuk meg a primycin ipari léptékű előállításának javítását, valamint a primycin szintézis hátterében húzódó folyamatok mélyreható megismerését a termelő *S. azurea* törzsek összehasonlító elemzése révén.

Klasszikus fermentáció optimalizációs vizsgálataink során igazoltuk, hogy az ipari szempontból hatékony primycin termelésben kritikus paraméter a fermentációs tápközeghez adagolt zsírsav szubsztrát minősége és mennyisége. A primycin bioszintetikus folyamatok szempontjából leghatékonyabb prekursor molekulának a hosszú, 16 szénatomot tartalmazó szénlánccal rendelkező palmitinsav bizonyult. A zsírsav koncentrációk tekintetében a 4,5 g/L-es végkoncentráció bizonyult a leghatékonyabbnak a hozamra gyakorolt hatás szempontjából. Eredményeink igazolták, hogy a palmitinsav nem csupán a sztearinsav alternatív komponenseként használható fel a fermentációs közegben, hanem a jövőben az újonnan tervezett és rendkívül hatékony primycin termelő fermentációs közeg standard komponenséül is szolgálhat.

A *S. azurea* SZMC 14600 törzs genomszekvenálási adatainak szisztematikus revíziójának köszönhetően jellemeztük a teljes primycin bioszintetikus génklasztert, amely kapcsán a primycin PKS struktúrgének és az L-arginin szintézis útvonalban résztvevő gének mellett további 16 gént azonosítottunk, melyek a primycin molekula bioszintézis folyamatának különböző szakaszaihoz köthetőek. Annak ellenére, hogy a *S. azurea* SZMC 14600 kapcsán újonnan összeszerelt és jellemzett primycin PKS génklaszter *in silico* elemzése nem mutatott ki szignifikáns strukturális különbségeket a két primycin-termelő törzs között, egyértelmű bizonyítékot találtunk a primycin PKS 18-as moduljában található aciltranszferáz domén szokatlan szubsztrátspecificitására.

A primycin bioszintézis génklaszter azonosítására irányuló *in silico* vizsgálataink megerősítették eddigi ismereteinket, miszerint az egyedüli primycin-termelőként ismert *S. azurea* mellett a *Saccharomonospora* nemzetség többi tagja nem rendelkezik a primycin termeléshez szükséges genetikai potenciállal. Mindazonáltal a primycin bioszintetikus gének és fehérjék NCBI adatbázisban lefuttatott homológia keresése nyomán mindezidáig ismeretlen, de teljes értékű, 18 modulból álló primycin PKS génklasztert és a kapcsolt módosító és szabályozó géneket tártunk fel *K. aridum* DSM 43828, *K. aridum* A82846 és *K. aridum* subsp. *largum* NRRL B-24462, valamint *A. orientalis* B-37 és *A. orientalis* DSM 40040 törzsekben.

A primycintermelő-képességben jelentkező mennyiségi különbségek háttérében rejlő folyamatok feltárása céljából elvégzett komparatív transzkripcionális analízis számos eltérő expressziót mutató gént eredményezett, melyeket prediktált funkciójuk alapján változatos GO, illetve COG kategóriákba soroltunk. Közülük a zsírsavszintézissel, self-rezisztenciával és másodlagos anyagcsere szabályozásával kapcsolatos gének, valamint a primycin A1 és deguanidino-amino-A1 komponensek közötti átalakulást katalizáló agmatináz enzimet kódoló gén primycin bioszintézisben betöltött szerepét tárgyaltuk. Transzkriptomikai vizsgálatainkkal párhuzamosan az agmatináz enzim aktivitására utaló deguanidino-amino-A1 és A1 primycin komponensek jelenlétét nagy teljesítményű folyadékkromatográfiával kapcsolt elektropray ionizációs tömegspektrométerrel szintén igazoltuk mindkét *S. azurea* törzs esetében a fermentlé extraktumokból.

A primycin bioszintézisért felelős génklaszter és vele együtt a primycin bioszintézis szabályozásának háttérében rejlő folyamatok megismerésére irányuló törekvéseink jó kiinduló pontként szolgálnak a tudatos törzsnemesítésen keresztül megvalósuló antibiotikum hozam növelésére, valamint lefektetik a primycin molekulák felhasználásán nyugvó racionális gyógyszertervezés alapjait.

IRODALOMJEGYZÉK

1. Lee Ventola C (2015) The Antibiotic Resistance Crisis Part 1: Causes and Threats. P T 40(4):277-283
2. World Health Organization (2019) No time to wait: Securing the future from drug-resistant infections - Report to the Secretary-General of the United Nations. United Nations Interagency Coordination Group on Antimicrobial Resistance 2019. <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/interagency-coordination-group/final-report/en>
3. Nikaido H (2009) Multidrug resistance in bacteria. Annu Rev Biochem 78:119-146
4. World Health Organization (2014) Antimicrobial resistance: global report on surveillance. France: World Health Organization. ISBN: 9789241564748
5. Vályi-Nagy T, Úri J, Szilágyi I (1954) Primycin, a New Antibiotic. Nature 174:1105-1106
6. Feiszt P, Mestyán Gy, Kerényi M, Dobay O, Szabó J, Dombrádi Zs, Urbán E, Emődy L (2014) Re-evaluation of *in vitro* activity of primycin against prevalent multiresistant bacteria. Int J Med Microbiol 304:1077-1085
7. Balouiri M, Sadiki M, Ibnsouda SK (2016) Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. J Pharm Anal 6:71-79
8. Meier-Kolthoff JP, Auch AF, Klenk H-P, Oker MG (2013) Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. BMC Bioinformatics 14:60
9. Blin K, Shaw S, Steinke K, Villebro R, Ziemert N, Lee SY, Medema MH, Weber T (2019) antiSMASH 5.0: updates to the secondary metabolite genome mining pipeline. Nucleic Acids Res 47:W81-W87
10. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. J Mol Biol 215:403-410
11. Anand S, Prasad MVR, Yadav G, Kumar N, Shehara J, Ansari MZ, Mohanty D (2010) SBSPKS: Structure based sequence analysis of polyketide synthases. Nucleic Acids Res 38:W487-496
12. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics 23:2947-2948

13. Afgan E, Baker D, Batut B, van den Beek M, Bouvier D, et al. (2018) The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. *Nucleic Acids Res* 46(W1):W537-W544
14. Trapnell C, Williams BA, Pertea G, Mortazavi AM, Kwan G, van Baren MJ, Salzberg SL, Wold B, Pachter L (2010) Transcript assembly and abundance estimation from RNA-Seq reveals thousands of new transcripts and switching among isoforms. *Nat Biotechnol* 28(5):511-515
15. Götz S, García-Gómez J, Terol J, Williams T, Nagaraj S, Nueda M, Robles M, Talón M, Dopazo J, Conesa A (2008) High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. *Nucleic Acids Res* 36:3420-3435
16. Markowitz VM, Mavromatis K, Ivanova NN, Chen IM, Chu K, Kyrpides NC (2009) IMG ER: A system for microbial genome annotation expert review and curation. *Bioinformatics* 25:2271-2278
17. Markowitz VM, Chen IMA, Palaniappan K, Chu K, Szeto E, Grechkin Y, Ratner A, Jacob B, Huang J, Williams P, Huntemann M, Anderson I, Mavromatis K, Ivanova NN, Kyrpides NC (2012) IMG: The integrated microbial genomes database and comparative analysis system. *Nucleic Acids Res* 40:D115-122
18. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods* 25(4):402-8
19. Csepregi K, Valasek A, Péntes Á, Tóth Zs, Kiss ÍÉ, Kerepesi I, Horváth B, Nagy I, Fekete Cs (2012) Draft genome sequence of an efficient antibiotic-producing industrial strain of *Saccharomonospora azurea*, SZMC 14600. *J Bacteriol* 194(5):1263
20. Smith S, Tsai SC (2007) The type I fatty acid and polyketide synthases: a tale of two megasynthases. *Nat Prod Rep* 24:1041-1072

Publikációs jegyzék

I. 1. A disszertáció témakörében készült publikációk:

1. **Kovács M**, Seffer D, Péntes-Húvös Á, Juhász Á, Kerepesi I, Csepregi K, Kovács-Valasek A, Fekete Cs (2020) Structural and functional comparison of *Saccharomonospora azurea* strains in terms of primycin producing ability. World J Microbiol Biotechnol 36:160 doi.org/10.1007/s11274-020-02935-x IF: 3.312 (2020)
2. **Kovács M**, Sefferné Szalai M, Sefer D, Pallos JP, Drávavölgyi G, Kovács-Valasek A, Kerepesi I (2019) Understanding the role of fatty acid substrates on primycin biosynthesis by *Saccharomonospora azurea* during batch fermentation. Nat Prod Commun 14:1-6 doi.org/10.1177/1934578X19858210 IF: 0.484 (2019)
3. Fodor I, Valasek A, Urbán P, **Kovács M**, Fekete Cs, Kerepesi I (2017) A comparative study on optimisation of protein extraction methods for *Saccharomonospora azurea*. Acta Biol Szeged 61(1):45-50
4. Valasek A, Kiss ÍÉ, Fodor I, **Kovács M**, Urbán P, Jám bor É, Fekete Cs, Kerepesi I (2016) Proteomic insight into the primycin fermentation process of *Saccharomonospora azurea*. Acta Biol Hung 67(4):424-430 doi.org/10.1556/018.67.2016.4.8 IF: 0.578 (2016)

II. 1. A disszertáció témakörében készült konferencia absztraktok:

1. **Kovács M**, Seffer D, Péntes-Húvös Á, Juhász Á, Kerepesi I, Csepregi K, Kovács-Valasek A, Fekete Cs (2020): Comparative Transcriptome Analysis of *Saccharomonospora azurea* strains in terms of primycin producing ability. Hungarian Molecular Life Science Conference 2021, 5-7 November 2021, Eger, Hungary
2. **Kovács M**, Sefferné Szalai M, Sefer D, Pallos JP, Drávavölgyi G, Kovács-Valasek A, Kerepesi I (2020): Enhancing of primycin production by *Saccharomonospora azurea* with various fatty acid substrates during batch fermentation. Congressus Pharmaceuticus Hungaricus XVI, 10-12. september 2020, Debrecen, Hungary
3. Valasek A, Kiss ÍÉ, Fodor I, **Kovács M**, Urbán P, Jám bor É, Fekete Cs, Kerepesi I (2016) Proteomic insight into the primycin fermentation process of *Saccharomonospora azurea*. 10th Central and Eastern European Proteomic Conference, 11-14. October 2016, Budapest, Hungary
4. Valasek A, Fodor I, Kiss ÍÉ, **Kovács M**, Tóth Zs, Urbán P, Jám bor É, Márk L, Fekete Cs, Kerepesi I (2015) From genomics to proteomics in the field of antibiotic research. Hungarian Molecular Life Sciences 2015, 27-29 March 2015, Eger, Hungary

II. 2. Egyéb konferencia absztraktok:

1. Sass V, Imri Á, **Kovács M**, Csicsek G, Ortmann-Ajkai A, Czakó-Vér K (2014) Talajmikrobiológiai vizsgálatok a Bükkhát Erdőrezervátum lékjeiben. Magyar Talajtani Társaság Vándorgyűlése, Keszthely, 2014. szeptember 4-6.
2. Imri Á, **Kovács M**, Kozma P, Csikász-Krizsics A, Árvay Gy, Czakó-Vér K (2012) A vízellátottság meghatározó szerepe a szőlő mikorrhiza kapcsolat alakulásában. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2012. évi Nagygyűlése, Keszthely, 2012. október 24-26.
3. **Kovács M**, Imri Á, Mátyás Á, Kozma P, Árvay Gy, Czakó-Vér K (2012) Mikorrhiza gyökérkolonizáció vizsgálata Jázmin szőlőfajtánál a termőre-fordulás évében. Talajtani Vándorgyűlés, Miskolc, 2012. augusztus 23-24-25.
4. **Kovács M**, Imri Á, Dudás M, Vincze V, Árvay Gy, Czakó-Vér K (2011) Soil dependent efficiency of plant-microbe (wheat-mycorrhiza) interaction at increasing doses of nitrogen fertilizer. 16th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, 20-20 July 2011, Budapest, Hungary
5. Imri Á, **Kovács M**, Tamási K, Czakó-Vér K, Árvay Gy (2011) Evaluation of a potential mycorrhiza inoculum on salt-affected contrasting soils and wheat host. 16th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, 20-20 July 2011, Budapest, Hungary
6. Czakó-Vér K, **Kovács M**, Imri Á, Biró B, Árvay Gy (2011) Mycorrhiza inoculation for improved grapevine production at vineyard conditions. 10th Alps-Adria Scientific Workshop, 14-19 March 2011, Opatija, Croatia
7. **Kovács M**, Árvay Gy, Czakó-Vér K (2010) Szőlő nedvességtartalmának alakulása mikorrhiza oltás mellett szabadföldi körülmények között. XVI. Nemzetközi Környezetvédelmi és Vidékfejlesztési Diákkonferencia, Mezőtúr, 2010. június 30. - július 2.