

**A szulfanilsav-bontó *Novosphingobium resinovorum* SA1
törzs strukturális genomikai és transzkriptomikai
vizsgálata**

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Hegedüs Botond

Témavezető:

Dr. Rákhely Gábor, tanszékvezető, egyetemi docens

Biológia Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Kar
Biotechnológiai Tanszék, Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai
Kutatóközpont Biofizikai Intézet

Szeged

2018

BEVEZETÉS

Az ipar folyamatos fejlődésén megy keresztül annak érdekében, hogy minél jobban kiszolgálhassa az emberi társadalom igényeit. A fejlődés egyik következménye hogy a kezdetben természetes eredetű alapanyagok helyét egyre inkább átveszik a módosított vagy teljes mértékben mesterségesen előállított vegyületek. Ezek a vegyületek nagy mennyiségben, olcsón, állandó minőségben előállíthatóak és olyan különleges tulajdonságokkal ruházhatóak fel, amellyel természetes megfelelőik nem rendelkeznek. Előállításuk és felhasználásuk során azonban elkerülhetetlenül kijutnak a környezetbe, ahol természetidegen tulajdonságaik miatt csak nagyon nehezen vagy egyáltalán nem bomlanak le. Ez felhalmozódásukhoz, rosszabb esetleg a táplálékláncba történő bejutásukhoz vezet. Egy ilyen mesterségesen előállított vegyület a szulfanilsav (SA) is, amelyet az ipar elsősorban festékek és gyógyszerek alapanyagaként használ fel nagy mennyiségben. Aromás szerkezete és természetidegen szulfonsav funkciós csoportja miatt a természetbe kijutva csak rendkívül lassan képes lebomlani. Nagyon speciális körülmények között azonban kialakulhatnak olyan baktérium törzsek, amelyek képesek ennek a vegyületnek a bontására és tápanyagforrásként történő felhasználására. Egy ilyen különleges baktérium törzs a *Novosphingobium resinovorum* SA1 is. A *Novosphingobium* nemzetségbe tartozó baktérium a nemzetségére jellemző változatos anyagcsere-útvonalainak és rendkívül hatékony alkalmazkodóképességének köszönhetően szinte egyedülálló módon önállóan, más baktériumok segítségével nélkül képes az SA bontására. A bontást lehetővé tevő metabolikus útvonalait napjainkig nem sikerült teljes mértékben feltárni, aminek a fő oka a törzs bonyolult genomösszetétele, az útvonalak feldaraboltsága és nagyon változatos összetétele. Kutatásom során célom volt a *Novosphingobium resinovorum* SA1 teljes genom szekvenciájának a meghatározása. A genom szekvenciájának ismeretében pedig az SA bontás útvonal felépítésének, szabályozásának és eredetének megismerése. Továbbá, RNA-Seq technika használatával igyekeztem képet alkotnia az SA és az esetleg vele együtt járó éhezés génkifejeződésre gyakorolt globális hatásáról. Az SA hatására megnövekedett kifejeződést mutató gének feltárásával pedig igyekeztem azonosítani azokat a kisegítő rendszereket, amelyek közvetett szerepet játszanak a hatékony bontás folyamatában.

ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

A szekvenálási projekt során három különálló genomi könyvtár szekvenálását végeztük el. A szekvenálások mindhárom esetben Illumina MiSeq platform használatával történtek.

A szekvenálás során kapott párosított végű (paired-end) és társított párosított végű (mate paired-end) leolvasásokat (read) együtt használtam fel, hibrid megközelítést követve az *N. resinovorum* SA1 törzs genomjának az összeillesztéséhez.

A bizonytalan vagy esetleg hiányos részeket polimeráz-láncreakció (PCR) és kapilláris szekvenálás alkalmazásával tisztáztam.

A kódoló genomi régiók jóslása és a jóslt régiók annotálása az NCBI (National Center for Biotechnology Information) PGAAP (Prokaryotic Genome Autonomic Annotation Pipeline) rendszerén keresztül történt és elérhetővé vált az NCBI GenBank és az Ensemble Genomes adatbázisokban.

A jóslt fehérjék ismételt annotálása az UniProt (Universal Protein Resource) és KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) rendszerein keresztül is megtörténtek és szintén elérhetővé váltak nyilvános adatbázisaikban. A fehérjéket COG (Clusters of Orthologous Groups of proteins) funkcionális kategóriákba sorolását az eggNOG-mapper programcsomag segítségével végeztem el az eggNOG 4.5.1 adatbázis használatával.

A különböző fajokban azonosított, az SA bontási útvonal felépítésében szerepet játszó fehérjék közötti azonosság mértékét globális (Needleman-Wunsch) illesztést segítségével határoztam meg.

Az SA bontási útvonalát felépítő enzimek, NCBI „RefSeq Representative genomes” adatbázisában előfordul lehetséges homológjait a TBLASTN programcsomag használatával azonosítottam.

A filogenetikai vizsgálatokhoz szükséges többszörös szekvencia illesztéseket a mafft 7 programcsomag, E-INS-I módszerével végeztem. A filogenetikai fa elkészítése a maximum likelihood módszerével történt, a Mega 6 programcsomag használatával.

Az *N. resinovorum* SA1 törzs fehérjét kódoló génjének relatív szinonim kodon használatában (Relative Synonymous Codon Usage - RSCU) előforduló eltéréseket korrespondencia analízis (Correspondence analysis – CA) segítségével vizsgáltam.

Az SA bontási útvonal perifériás és centrális szakaszának kifejezésért felelős promóter régió azonosításának érdekében speciálisan tervezett primerpárok segítségével különböző hosszúságú intergénikus régiókat sokszorosítottam fel polimeráz-lánreakció (PCR) használatával.

A felsokszorosított DNS szakaszokat GFP marker gént tartalmazó promóter próba vektorba illesztettem, amit első lépésben *Escherichia coli* törzsbe transzformáltam, majd az ebből a törzsből visszaizolált plazmidot elektroporáció segítségével *N. resinovorum* SA1 törzsbe juttattam. A különböző körülmények között növesztett, transzformált *N. resinovorum* SA1 törzs GFP kifejező képességét fotofluorométer segítségével követtem.

Az RNA-Seq vizsgálatokhoz szükséges RNS-t a glükózon és a szulfanilsavon növesztett, exponenciális és stacioner növekedési fázisban lévő *N. resinovorum* SA1 sejtekből izoláltam.

A tisztított, riboszómális RNS-mentesített mintákból készített cDNS könyvtárak szekvenálása Illumina MiSeq platform használatával történt.

A szekvenálás során kapott leolvasásokat CLC Genomic Workbench 7 programcsomag segítségével tisztítottam és illesztettem *N. resinovorum* SA1 törzs genomjának fehérjét kódoló régiójára.

A gének kifejeződésében megfigyelhető változásokat EdgeR programcsomag segítségével vizsgáltam.

Az RNA-Seq vizsgálatok során tapasztalt génekifejeződés változást néhány gén esetén RT-qPCR segítségével ellenőriztem.

AZ ÉRTEKEZLET EREDMÉNYEI

Kutatásom során meghatároztam a szulfanilsavat önállóan bontani képes *Novosphingobium resinovorum* SA1 törzs genom szekvenciáját. Azonosítottam a bontást lehetővé tevő enzimek génjeit. Vizsgáltam azok eredetét és szabályozásuk logikáját. Továbbá RNA-Seq segítségével átfogó képet alkottam az SA génkifejeződésre gyakorolt hatásáról.

- I. Második generációs DNS szekvenálási technikák használatával sikerült az *N. resinovorum* SA1 törzs teljes genom szekvenciájának a meghatározása. A sejt komplex genom összetétellel rendelkezik. A kromoszómáján túl további négy (pSA1-4) plazmidot sikerült azonosítani, amelyek közül három mérete meghaladja a 100 kbp-t.
- II. Az *N. resinovorum* SA1 törzs szulfanilsav (SA), benzoát (B) és hidoxibenzoát (HB) bontó képességét lehetővé tevő katabolikus útvonalak génjeit a törzs nagyméretű plazmidjain sikerült azonosítanom. Amíg az SA bontási útvonal génjei két elkülönült génklasztert alkotnak a pSA3-as plazmidon, addig B és a HB útvonalak génjei egy-egy különálló operonba rendeződnek a pSA1 plazmidon.
- III. Az SA bontási útvonal génjeit tartalmazó klaszterek a bontás folyamatának különböző szakaszaiért felelősek. Amíg a kisebb méretű klaszter a bontás perifériás szakaszát (SadAB), addig a nagyobb méretű klaszter a bontás centrális szakaszát felépítő enzimek génjeit (ScaABCEF) tartalmazza.
- IV. A génklaszterek felépítése és a gének által kódolt fehérjék szekvenciája is nagymértékben hasonlít a más baktériumokban már korábban megismertekhez.
- V. Az NCBI adatbázisán végzett keresés alapján az *N. resinovorum* SA1 törzsben található, az SA bontás perifériás szakaszát felépítő fehérjék (SadAB) legnagyobb hasonlóságot a *Bradyrhizobiaceae* család tagjaiban előforduló homológjaikkal mutatták.
- VI. Ismételt keresés eredményeképpen sikerült feltárnom, hogy a korábban leírt SA-bontó képességekkel rendelkező baktérium törzseket tartalmazó *Comamodaceae* és *Bradyrhizobiaceae* család tagjai esetén a SadAB gén klaszter által kódolt fehérjék homológjai széles körben előfordulnak, azonban a *Sphingomonadaceae* család tagjai esetén, ahova a *N. resinovorum* SA1 törzs is tartozik, ez nem volt megfigyelhető.

- VII. A centrális útvonal elemei lényegesen ritkábban fordulnak elő a baktériumok között, csak azokban a baktérium fajokban voltak megtalálhatóak, amelyek képesek a szulfokatekol (SC) bontására.
- VIII. Az *N. resinovorum* SA1 törzs kodon preferenciájának korrespondencia analízissel történő vizsgálata azt mutatta, hogy az SA bontás útvonal génjeinek kodon preferenciája lényegesen eltér a sejt többi génjének kodonhasználatától. Ez különösen igaz a perifériás útvonal génjeire.
- IX. Az elvégzett vizsgálatok alapján feltételezhető hogy az SA bontás útvonala egy nem olyan régen bekövetkezett horizontális géntranszfer eredményeképpen alakulhatott ki az *N. resinovorum* SA1 törzs esetén.
- X. Promóter próba vektor (pPROBE) segítségével sikerült feltérképeznem a perifériás és a centrális útvonal kifejeződéséért felelős genomi régiókat. Az azonosított promóterek eltérő szabályozási logikát követnek. A perifériás útvonal viszonylag magas alap kifejeződési szinttel rendelkezik, amely az SA hatására nem, azonban éhezés hatására tovább növekszik. Ezzel szemben a centrális útvonal minimális alap kifejeződési szintet mutat, ami SA hatására jelentősen megugrik.
- XI. A centrális útvonal szabályozását tovább színesíti a karbon katabolit represszió hatása, amely megakadályozza az operon SA-függő kifejeződését könnyen hasznosítható szénforrás jelenlétében.
- XII. A glükóz és szulfanilsav tápanyagforráson növesztett exponenciális és stacioner növekedési fázisban lévő sejtekből származó mintákkal végzett RNA-Seq vizsgálatból az látszik, hogy a legtöbb gén kifejeződése az exponenciális növekedési fázisból a stacioner fázisba történő átmenet során változott. Az eltérő szénforráson növesztett, exponenciális fázisban lévő sejtek között ettől kisebb mértékű, de jelentős génkifejeződés változás volt megfigyelhető.
- XIII. Az elvégzett géncsoport túlréprezentációs elemzés (GSOA) és a géncsoport dúsulási vizsgálat (GSEA) alapján az exponenciális fázisból a stacioner fázisba történő váltás során szénforrástól függetlenül, nagyrészt megegyező funkciójú csoportokban volt megfigyelhető szignifikáns változás. A változás minden esetben csökkenő volt és tükrözte az éhezés sejtre gyakorolt hatását. Az eltérő szénforráson növesztett,

exponenciális fázisban lévő sejtek esetén is inkább az éhezésre utaló jelek voltak megfigyelhetők

- XIV. Az SA bontásban résztvevő gének kifejeződése a promóter vizsgálatok esetében tapasztaltakat tükrözte. A perifériás útvonal génjei magas alap kifejeződéssel rendelkeznek, amely az éhezés hatására tovább növekszik. Ezzel szemben a centrális útvonal génjeinek szabályozása SA-függő. A közös útvonal szakasz pedig érdekes módon nem reagált se a szulfanilsav (SA), se az esetleges éhezés hatására.
- XV. Sikertelenül azonosítottam a centrális útvonal lehetséges elektrontranszport láncát, amely egy glutation-reduktáz (GR) és egy növényi típusú ferredoxin (Fer2) fehérjéből épül fel.
- XVI. A transzkriptóm analízis alapján az SA felvételéért egy, az MFS szupercsaládba tartozó transzporter felelős.
- XVII. Több olyan enzim génjét sikerült azonosítani, amelyek szerepet játszhatnak az SA bontás során felszabaduló szulfit elleni hatékony védekezésben. Ezek közül három szulfit transzporter, amelyek feladata a keletkező szulfitnak a sejt perifériás terébe történő juttatása, kettő pedig szulfit oxidáló enzim, amelyek a periplazmatikus térbe jutott szulfit szulfittá történő átalakítását végzik.
- XVIII. Az RNA-Seq vizsgálat során azonosított fontosabb gének kifejeződését RT-qPCR használatával is igazoltam.

TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK

A dolgozat alapját képező közlemények:

1. **Botond Hegedüs**, Péter B. Kós, Gábor Bende, Naila Bounedjoum, Gergely Maróti, Krisztián Laczi, Márk Szuhaj, Katalin Perei, Gábor Rákhely: Starvation- and xenobiotic-related transcriptomic responses of the sulfanilic acid-degrading bacterium, *Novosphingobium resinovorum* SA1, Applied Microbiology and Biotechnology 102: pp. 305-318. (2018), **IF: 3,420**

2. **Botond Hegedüs**, Péter B. Kós, Balázs Bálint, Gergely Maróti, Han Ming Gan, Katalin Perei, Gábor Rákhely: Complete genome sequence of *Novosphingobium resinovorum* SA1, a versatile xenobiotic-degrading bacterium capable of utilizing sulfanilic acid, Journal of Biotechnology 241: pp. 76-80. (2017), **IF: 2,599**

Egyéb közlemények:

3. **Hegedüs Botond**, Kós Péter, Bende Gábor, Laczi Krisztián, Perei Katalin, Rákhely Gábor: Characterization of the biodegradation processes in *Novosphingobium subarcticum* SA1 grown on sulfonated aromatic compound in batch fermenter, Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica 64:(suppl. 1) pp. 33-34. (2017)

4. Gábor Rákhely, **Botond Hegedüs**, Gábor Bende, Katalin Perei: Omics of sulfanilic acid biodegradation in *Novosphingomonas subarcticum*, New Biotechnology, 33: S129-S130 (2016)

5. Gábor Rákhely, Attila Bodor, **Botond Hegedüs**, Ágnes Kis, Krisztián Laczi, Gergely Maróti, Katalin Perei: How to eat toxic compounds? Metabolic insights into microbial degradation of xenobiotics, MTA SZBK Straub- napok 2016. május 25-26. (2016)

6. **Botond Hegedüs**, Zsolt Péntzes, Gábor Bende, Katalin Perei, Gábor Rákhely: Replication and Partition System of the *Novosphingobium* Plasmids, Book of Abstracts of the 6th European Bioremediation Conference (ebc-vi 2015), 2015. p. 181. 1 p.

7. Gábor Rákhely, **Botond Hegedüs**, Ágnes Kis, Krisztián Laczi, Gábor Bende, Attila Bodor, Katalin Perei: Metabolic insight into biodegradation of sulfonated aromatic and other industrial hydrocarbon wastes, Book of Abstracts of the 6th European Bioremediation Conference (ebc-vi 2015), 2015. p. 256. 1 p.

8. Krisztián Laczi, Ágnes Kis, Balázs Horváth, Gergely Maróti, **Botond Hegedüs**, Katalin Perei, Gábor Rákhely: Metabolic responses of *Rhodococcus erythropolis* PR4 grown on diesel oil and various hydrocarbons, Applied Microbiology and Biotechnology 99:(22) pp. 9745-9759. (2015), **IF: 3,337**

9. **Botond Hegedüs**, Mónika Magony, Krisztián Laczi, Katalin Perei, Gábor Rákhely, András Tóth: Metabolic and protein-protein interactions involved in the sulfanilic acid degradation in *Novosphingobium subarcticum* SA1, Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica 60:(Suppl.) p. 24. (2013)

10. **Botond Hegedüs**: The molecular mechanism of sulfanilic acid biodegradation, Acta Biologica Szegediensis 57:(1) pp. 86-87. (2013)

11. **Botond Hegedüs**, Katalin Perei, Mónika Magony, Krisztián Laczi, András Tóth, Kornél L. Kovács, Gábor Rákhely: Metabolic and protein-protein interactions of sulfanilic acid catabolism in *Novosphingobium subarcticum* SA1, Environmental Engineering and Management Journal 11:(3/Suppl.) p. S20. (2012)

12. Gábor Rákhely, **Botond Hegedüs**, Mónika Magony, Krisztián Laczi, András Tóth, Gergely Maróti, F K Medzihradzsky, Kornél L. Kovács, Katalin Perei: Metabolism of sulfonated aromatic compounds in *Novosphingobium subarcticum* SA1 strain, Environmental Engineering and Management Journal 11:(3/Suppl.) p. S5. (2012)

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom mindenkinek, aki segített abban, hogy ez a munka elkészülhessen.

Különösen hálás vagyok témavezetőmnek **Dr. Rákhely Gábornak**, hogy vállalta a szakmai irányításomat, ezáltal elindított a kutatói pályán. Köszönöm a hosszú éveken át tartó türelmét, iránymutatását és önzetlen segítségét.

Köszönöm Prof. Dr. Kovács Kornélnak, hogy a kezdetekkor biztosította, hogy elkezdhessem kutatásaimat a Biotechnológiai Tanszéken. Hálás köszönet neki továbbá, hogy hosszú évek alatt mindig számíthattam értékes tanácsaira, szakmai észrevételeire.

Köszönöm szakdolgozóink (**Fatime, Móni, Gábor, Boglárka, Laura**) szorgalmas munkáját, akikkel mindig öröm volt együtt dolgozni.

Továbbá köszönettel tartozom az **SZTE Biotechnológiai Tanszék és az MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont Biofizikai Intézet minden jelenlegi és volt dolgozójának** a munkám sikeréhez való hozzájárulásukért.

Köszönettel tartozom a **Magyar Tudományos Akadémia, Szegedi Biológiai Kutatóközpont Biofizikai Intézetének**, hogy Fiatal Kutatói ösztöndíjjal támogatott.

Végül, de nem utolsó sorban mérhetetlen hálát érzek a **Családom és Barátaim** iránt, akik támogatása nélkül nem tarthatnék itt.

TÁRSSZERZŐI NYILATKOZAT

Kijelentem, hogy tisztában vagyok Hegedüs Botond doktorjelölt disszertációjában megfogalmazott tudományos eredményekkel, továbbá hozzájárulok ahhoz, hogy a disszertációban megjelölt publikációkat a védési eljárásban a doktorjelölt felhasználja.

Kijelentem továbbá, hogy ezeket a publikációkat Ph.D. fokozatszerzési eljárásban eddig nem használtam fel és ezt a jövőben sem teszem.

Botond Hegedüs, Péter B. Kós, Balázs Bálint, Gergely Maróti, Han Ming Gan, Katalin Perei, Gábor Rákhely: Complete genome sequence of *Novosphingobium resinovorum* SA1, a versatile xenobiotic-degrading bacterium capable of utilizing sulfanilic acid, JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY 241: pp. 76-80. (2017)

.....
Dr. Kós B. Péter **Dr. Bálin Balázs** **Dr. Maróti Gergely** **Dr. Han Ming Gan**

.....
Dr. Perei Katalin **Dr. Rákhely Gábor**

Szeged, 2018. október 8.

Botond Hegedüs, Péter B. Kós, Gábor Bende, Naila Boundedjoum, Gergely Maróti, Krisztián Laczi, Márk Szuhaj, Katalin Perei, Gábor Rákhely: Starvation- and xenobiotic-related transcriptomic responses of the sulfanilic acid-degrading bacterium, *Novosphingobium resinovorum* SA1, *APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY* 102: pp. 305-318. (2018)

.....
Dr. Kós B. Péter	Bende Gábor	Boundedjoum Naila	Dr. Maróti Gergely
.....
Dr. Laczi Krisztián	Szuhaj Márk	Dr. Perei Katalin	Dr. Rákhely Gábor

Szeged, 2018. október 8.