

**Ph.D. értekezés tézisei**

**A funkcionális metagenomika módszerének  
kiterjesztése kórokozó baktériumokra az  
antibiotikumrezisztencia vizsgálatának céljából**

Számel Mónika

**Témavezető:**

Dr. Pál Csaba

Dr. Kintsés Bálint

Szegedi Tudományegyetem Biológia Doktori Iskola  
Eötvös Loránd Kutatási Hálózat Szegedi Biológiai  
Kutatóközpont – Biokémiai Intézet

2022

## **Bevezetés**

Az antibiotikumrezisztencia napjainkra az egyik legégetőbb egészségügyi problémává vált és pesszimista becslések szerint az elkövetkezendő évtizedekben csak nőni fog a rezisztens fertőzések száma. Ebben a krízishelyzetben nagy szükség lenne olyan antibiotikumokra, amelyekkel szemben lassabban alakul ki rezisztencia.

A kórokozó baktériumok kétféle módon válhatnak rezisztenssé egy antibiotikummal szemben: a saját génjeikben bekövetkező mutációk révén, valamint a környezetükben élő más baktériumoktól szerzett rezisztenciát okozó gének felvétele, horizontális géntranszfer által. A gyógyszerfejlesztési folyamatban jelenleg csak a mutációk megjelenésére fókuszálnak, az utóbbi folyamat lehetőségét nem veszik figyelembe. A horizontális géntranszfernek azonban jelentős szerepe van a multirezisztens baktériumok kialakulásában, mivel a környezetünkben, pl. a talajban vagy a saját bélflóránkban is számos, a kórokozók számára elérhető rezisztenciagén található. Ezek gének funkcionális metagenomikai szűrések során azonosíthatók. Több tanulmány született már, amelyek a környezetben jelen lévő rezisztenciagének

hatását vizsgálta. Azonban ezek mindegyike az *Escherichia coli* valamely labortörzsét használta a szűrések során gazaként. A laboratóriumi törzsek azonban egyrészt lényegesen eltérhetnek a kórokozóktól, másrészt egyetlen gazda használatával nem lehetünk biztosak abban, hogy a rezisztóm teljes egészét azonosítjuk.

### **Célkitűzések**

Munkám célja egy olyan funkcionális metagenomikai módszer kidolgozása, amely segítségével nem hagyományos kórokozó baktériumtörzsekbe nagyméretű metagenomikai könyvtárak juttathatók be transzdukáló fágreszecskek felhasználásával. A funkcionális szelekció célja antibiotikumrezisztencia-gének azonosítása volt újonnan bevezetett vagy még klinikai tesztelés alatt álló antibiotikumokkal szemben. A munka során az alábbiakat tűztem ki célul:

1. *Környezeti forrásokból származó két metagenomikai könyvtár, valamint rezisztens kórokozó baktériumok genomjából egy genomi könyvtár létrehozását.*
2. *Annak tesztelését, hogy bejuttatható-e megfelelő, azaz az elektroporációval összevethető hatékonysággal egy több millió klónt tartalmazó metagenomikai könyvtár*

*kórokozó baktériumokba hibrid transzdukáló fágreszecskek segítségével.*

3. *A transzdukció esetleges negatív hatásának vizsgálatát a könyvtár összetételére és minőségére nézve, az elektroporációval összehasonlítva.*
4. *A három könyvtárban előforduló antibiotikumrezisztencia-gének azonosítását.*
5. *Megvizsgálni, hogy van-e különbség a különböző baktériumfajokban azonosított rezisztenciagén-repertoárok között.*
6. *Összehasonlítani az új és régi antibiotikumokat a velük szemben azonosított rezisztenciagének száma alapján.*

## **Alkalmazott módszerek**

### *Metagenomikai könyvtárak létrehozása*

Három forrásból (antibiotikum szennyezett talaj, emberi bél mikrobiom és 68 multirezisztens kórokozó genomja) származó metagenomikai DNS-ből összesen 25 Gbp méretű plazmidkönyvtárat hoztunk létre, amely kb. 2000 baktérium genomjának felel meg.

### *Transzdukció és elektroporáció*

A metagenomikai könyvtárakat T7 alapú hibrid bakteriofágok kapszidjába csomagoltuk. Összesen kétféle

T7 alapú hibrid fágot és egy mutagenizált T7 fágot alkalmazva az alábbi kórokozókba juttattuk be a könyvtárakat: *Klebsiella pneumoniae* NCTC 9131, *Shigella sonnei* HNCMB 25021 és *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium str. LT2. Továbbá elektroporációval juttattuk be a könyvtárakat *Escherichia coli* K12 BW25118 törzsbe.

#### *Funkcionális szelekció antibiotikumok jelenlétében*

Grádiens agarlemezeken funkcionális szelekciót végeztünk 6, a gyógyászatban régóta alkalmazott, és 7, az elmúlt 2-3 évben bevezetett, vagy jelenleg is tesztelés alatt álló antibiotikum jelenlétében. A szelekciókat mindhárom könyvtár és mind a négy törzs esetén elvégeztük, a rezisztens kolóniákat összegyűjtöttük. A szűrések során kontrollként mindhárom törzs esetén a metagenomikai inszert nélküli plazmidot hordozó sejteket használtunk.

#### *Rezisztens találatok azonosítása szekvenálással*

A rezisztens találatokat hosszú leolvasású Nanopore és rövid leolvasású Illumina szekvenálás kombinációjával azonosítottuk. A Nanopore szekvenálást a Pécsi Tudományegyetem Bioinformatika Kutatócsoport munkatársai végezték. Az Illumina szekvenálást a Szegedi

Tudományegyetem Biokémia és Molekuláris Biológia Tanszék munkatársai Dr. Bodai László és Dr. Zsindely Nóra, valamint a Delta Bio 2000 Kft. végezte. A rezisztens találatokat a CARD (Comprehensive Antibiotic Resistance Database) és a ResFinder rezisztencia-adatbázisok felhasználásával BLAST analízissel azonosítottuk.

### *Rezisztencia fenotípus mérése*

A rezisztens találatok által biztosított rezisztenciaszintet minimális gátló koncentráció (MIC) meghatározásával, lemezen 12 lépéses mikrodilúciós módszerrel mértük. A rezisztens találatok mellett kontrollként a metagenomikai inszert nélküli plazmidot hordozó sejteket használtunk.

### **Eredmények összefoglalása**

Első lépésként háromféle környezeti forrás használatával készítettünk metagenomikai és genomi könyvtárakat: erősen antibiotikum szennyezett talajból és folyóüledékből, amelyek India egyik ipari vidékéről származtak; 10 egyén bél mikrobiomjából; valamint 68 többszörösen rezisztens kórokozó genomjából. A metagenomikai DNS-t alacsony kópiaszámú vektorba klónoztuk, amely tartalmazta a T7 bakteriofág kapszidjába való csomagoláshoz szükséges csomagoló szignál

szekvenciát. A könyvtárak 3-5 millió klónt tartalmaztak, teljes méretük 25 Gb, amely kb. 2000 bakteriális genomnak felel meg. Egy korábbi tanulmányt alapul véve a könyvtárak mindegyikét transzdukáló bakteriofágokba csomagoltuk. A könyvtárakat az alábbi baktériumtörzsekbe juttattuk be transzdukcióval: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium str. LT2, *Klebsiella pneumoniae* NCTC 9131, és *Shigella sonnei* HNCMB 25021, valamint elektroporációval: *Escherichia coli* K12 BW25118. Az elektroporáció és transzdukció összehasonlításának eredménye alapján a transzdukció legalább 2 nagyságrenddel hatékonyabbnak bizonyult a kórokozó törzsek esetén, mint az elektroporáció ugyanezen törzsekbe, valamint legalább olyan hatékony volt, mint az elektroporáció *E. coliba*.

A transzdukció esetleges negatív hatásainak vizsgálata során bizonyítottuk, hogy a transzdukció sem a könyvtárak diverzitására, sem az átlagos inszertméretre nincs negatív hatással, mivel a transzdukált könyvtárak az elektroporált könyvtárhoz hasonló mintázatot mutattak. Továbbá a transzdukció esetén nem volt nagyobb a fals pozitív találatokhoz vezető kettős transzformánsok aránya az elektroporációval összehasonlítva.

Következő lépésként funkcionális metagenomikai szűrést végeztünk a négy baktériumtörzsben. A kísérletekben 6 régóta használatban lévő és 7 új antibiotikumot használtunk, amelyek 5 antibiotikumcsaládot fednek le. A szelekciós kísérletek egy részét két replikátumban végeztük, a replikátumok között 81%-os átfedést tapasztaltunk. A funkcionális szűrések során 571 rezisztenciát biztosító fragmenst azonosítottunk, amelyek 84%-a mutatott jelentős homológiát ismert rezisztenciagénekkel. A fragmenseken található ARG-ket klasztereztük, így összesen 114 ARG-t azonosítottunk. Ezek közül az *E. coliban* a gének mindössze 67%-a okozott rezisztenciát, a fajok közötti átlagos átfedés az ARG-k számában 45% volt. Az azonosított ARG-k forrása főként a Proteobaktériumok törzséből származik és a legtöbb ismert rezisztenciamechanizmust lefedi.

A következő lépésként meghatároztuk, hogy az azonosított ARG-k közül melyek adódnak át horizontális géntranszferrel a természetben. Megállapítottuk, hogy azok az ARG-k, amelyek mobilisak, több DNS fragmensben találhatóak meg a könyvtárainkban. Különbséget találtunk továbbá a mobilis ARG-k arányában a könyvtárak között.



Az ARG-k fajspecifikusságának ellenőrzéséhez egy rezisztenciafenotípus-vizsgálatot és egy második szelekciós kísérletet végeztünk. A szelekciós kísérlet során az 571 rezisztenciát okozó fragmenst újra bejuttattunk a 4 törzsbe, majd szelektáltuk antibiotikumok jelenlétében. A szelekció során a négy gazdában összesen 63 ARG-t azonosítottunk, melyek kb. fele adott rezisztenciát mind a 4 törzsben. Megállapítottuk, hogy a mind a négy törzsben funkcionális ARG-k esetén a fajspecifikus hatás a rezisztencia szintjében jelenik meg az efflux pumpák, a transzkripciós szabályozófehérjék és az antibiotikum módosító enzimek esetén.

Végezetül megállapítottuk, hogy az új antibiotikumokkal szemben a környezetben található ARG-k száma, beleértve a mobilis ARG-ket, nem tér el szignifikánsan a régi antibiotikumtól. Ezen kívül jelentős átfedést tapasztaltunk a két csoport között az ARG repertoárokat tekintve.

## **Summary**

Antibiotic resistance has become one of the most pressing health problems in the past decades as newly developed antibiotics are less efficient to treat infections. Resistance in bacteria can emerge by mutations or by

horizontal gene transfer. Since the examination of the latter process is ignored when a new antibiotic is tested for potential resistance in drug development pipelines, antibiotics lose their efficacy very fast.

Functional metagenomics is a powerful tool to identify genes that are potential candidates to horizontal gene transfer. However, the technique relies on the usage of a single laboratory model strains, usually *Escherichia coli*. Our aim was to expand functional metagenomics to multiple, non-model bacteria. To achieve this goal, we developed a technique, called DEEPMINE, that utilizes hybrid transducing bacteriophage particles to transduce the libraries into different pathogens. By using these bacteriophages, we managed to transduce metagenomic libraries into pathogenic strains of *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica* and *Shigella sonnei*. Next, we performed functional selection experiments in the presence of 13 antibiotics which revealed that multiple hosts identify more resistance genes than *E. coli* alone. We also found high variations in resistance levels when expressing the same resistance genes in the different hosts. Finally, our functional metagenomic screens revealed high

number of mobile resistance genes against newly developed antibiotics.

### **Az értekezés alapjául szolgáló publikáció**

Gábor Apjok, Mónika Számel, Chryso Christodoulou, Viktória Seregi, Bálint Márk Vásárhelyi, Tamás Stirling, Bálint Eszenyi, Tóbiás Sári, Fanni Vidovics, Erika Nagrand, Dorina Kovács, Petra Szili, Ildikó Ilona Lantos, Orsolya Méhi, Pramod K. Jangir, Róbert Herczeg, Bence Gálik, Péter Urbán, Attila Gyenesei, Gábor Draskovits, Ákos Nyerges, Gergely Fekete, László Bodai, Nóra Zsindely, Béla Dénes, Ido Yosef, Udi Qimron, Balázs Papp, Csaba Pál & Bálint Kintsés, "Characterization of antibiotic resistomes by reprogrammed bacteriophage-enabled functional metagenomics in clinical strains." NATURE MICROBIOLOGY, 2023, 1-14.

IF: 30,964

### **Egyéb publikációk**

Kintsés B., Jangir P. K., Fekete G., Számel M., Méhi O., Spohn R., Daruka L., Martins A., Hosseinnia A., Gagarinova A., Kim S., Phanse S., Csörgő B., Györkei Á., Ari E., Lázár V., Nagy I., Babu M., Pál C. és Papp B., "Chemical-genetic profiling reveals limited cross-resistance between antimicrobial peptides with different modes of action," NATURE COMMUNICATIONS, vol. 10, no. 1, 2019.

IF: 17,694

Spohn R., Daruka L., Lazar V., Martins A., Vidovics F., Grezal G., Méhi O., Kintsés B., Számel M., Jangir P. K., Csörgő B., Györkei A.,

Bodi Z., Farago A., Bodai L., Foldesi I., Kata D., Maroti G., Pap B., Wirth R., Papp B. és Pal C., "Integrated evolutionary analysis reveals antimicrobial peptides with limited resistance," NATURE COMMUNICATIONS, vol. 10, 2019.

IF: 17,694

Kintses B., Méhi O., Ari E., Számel M., Györkei Á., Jangir P. K., Nagy I., Pál F., Fekete G., Tengölics R., Nyerges Á., Likó I., Bálint A., Molnár T., Bálint B., Vásárhelyi B. M., Bustamante M., Papp B. és Pál C., "Phylogenetic barriers to horizontal transfer of antimicrobial peptide resistance genes in the human gut microbiota," NATURE MICROBIOLOGY, vol. 4, no. 3, pp. 447–458, 2019.

IF: 30,964

Nyerges A., Csorgo B., Draskovits G., Kintses B., Szili P., Ferenc G., Revesz T., Ari E., Nagy I., Balint B., Vasarhelyi B., Bihari P., Szamel M., Balogh D., Papp H., Kalapis D., Papp B. és Pal C., "Directed evolution of multiple genomic loci allows the prediction of antibiotic resistance.," PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, vol. 115, no. 25, pp. E5726–E5735, 2018.

IF: 11,205

Lazar V., Martins A., Spohn R., Daruka L., Grezal G., Fekete G., Szamel M., Jangir P., Kintses B., Csorgo B., Nyerges A., Györkei A., Kincses A., Der A., Walter F., Deli M., Urban E., Hegedus Z., Olajos

G., Mehi O., Balint B., Nagy I., Martinek T., Papp B. és Pal C.,  
“Antibiotic-resistant bacteria show widespread collateral  
sensitivity to antimicrobial peptides,” NATURE MICROBIOLOGY,  
vol. 3, no. 6, pp. 718–731, 2018.

IF: 30,964

**Kumulatív impakt faktor: 139.485**

### **Társszerzői nyilatkozat**

Kijelentem, hogy ismerem **Számel Mónika** PhD fokozatra  
pályázó doktorjelölt **„A funkcionális metagenomika  
módszerének kiterjesztése kórokozó baktériumokra  
az antibiotikumrezisztencia vizsgálatának céljából”**  
című disszertációját.

Felelős szerzőként kijelentem, hogy Számel Mónika  
jelentősen hozzájárult az alább felsorolt tudományos  
publikációk eredményéhez.

1. Apjok G., **Számel M.**, Christodoulou C., Seregi V.,  
Vásárhelyi B., Vidovics F., Eszenyi B., Sári T., Stirling T.,  
Nagrand E., Kovács D., Lantos I., Szili P., Méhi O., Jangir P. K.,  
Herczeg R., Gálik B., Urbán P., Gyenesei A., Draskovits G.,  
Nyerges Á., Fekete G., Bodai L., Zsindely N., Pintér L., Dénes  
B., Yosef I., Qimron U., Papp B., Pál C. és Kintsés B.,

“Characterization of antibiotic resistomes by reprogrammed bacteriophage-enabled functional metagenomics in clinical strains” NATURE MICROBIOLOGY, 2023, 1-14

2. Kintses B., Méhi O., Ari E., **Számel M.**, Györkei Á., Jangir P. K., Nagy I., Pál F., Fekete G., Tengölics R., Nyerges Á., Likó I., Bálint A., Molnár T., Bálint B., Vásárhelyi B. M., Bustamante M., Papp B. és Pál C., “Phylogenetic barriers to horizontal transfer of antimicrobial peptide resistance genes in the human gut microbiota,” NATURE MICROBIOLOGY, vol. 4, no. 3, pp. 447–458, 2019.

Igazolom, hogy az ebben a dolgozatban bemutatott eredményeket egyetlen más PhD dolgozat sem mutatta be és a jövőben sem használják fel tudományos fokozat megszerzéséhez.

Szeged, 2023. február 20.

.....

Dr. Pál Csaba

.....

Dr. Kintses Bálint