

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Cianobaktériumok peptid mintázatainak
elemzése**

Riba Milán

Témavezető: Prof. Dr. Vasas Gábor



DEBRECENI EGYETEM

GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK Doktori Iskola

Debrecen, 2020

CIANOBAKTÉRIUMOK PEPTID MINTÁZATAINAK ELEMZÉSE

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a gyógyszerészeti tudományok tudományágban*

Írta: Riba Milán okleveles biológus

Készült a Debreceni Egyetem Gyógyszerészeti Tudományok doktori iskolája
(Farmakológia doktori programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Vasas Gábor, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Tósaki Árpád, az MTA doktora
tagok: Dr. Horváth Györgyi, PhD
Dr. Emri Tamás, az MTA doktora

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK
Gyógyszerhatástani Tanszék, Könyvtár
2018. április. 23.

Az értekezés bírálói:

Dr. Vasas Andrea, PhD
Dr. Bácsi István, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Tósaki Árpád, az MTA doktora
tagok: Dr. Bácsi István, PhD
Dr. Emri Tamás, az MTA doktora
Dr. Horváth Györgyi, PhD
Dr. Vasas Andrea, PhD

Az értekezés védésének időpontja: online webes felületen keresztül (Zoom)
2020. december 7, 11:00

Amennyiben a vitán részt kíván venni, úgy jelezze a milan.riba@gmail.com e-mail címre a vitát megelőző nap (2020. december 6.) 20:00 óráig. A határidő lejáratát követően technikai okok miatt már nincs lehetőség a védéshez kapcsolódni.

I. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS

A cianobaktériumok (kékalgák) világszerte változatos körülmények között fellelhető ősi mikroorganizmusok, megtalálhatók az édes és sós vizekben, valamint a sziklák és a talaj megvilágított felületein is. Oxigéntermelő fotoszintézisük révén jelentős szerepük volt a Föld aerob légkörének kialakításában, és fontos szerepet játszanak a szén, nitrogén és ásványi anyagok biológiai ciklusában. A cianobaktériumok számos vízi és szárazföldi tápláléklánc alapját képezik, és a biotechnológiában is egyre növekszik az alkalmazásuk, kezdve a bio-trágyázószerek előállításától a potenciális gyógyszerekig [1]. Egyes fajaik képesek lehetnek potenciális toxikus metabolitokat (cianotoxinokat), illetve egyéb biológiai szempontból jelentős anyagokat előállítani. Az elmúlt években számos cianobakteriális metabolitot azonosítottak, melyek igen változatos biológiai aktivitással rendelkeznek. Napjainkban a növények és egyes mikroorganizmusok kimondottan nagy gyógyászati jelentőséggel bírnak, ezek a legfontosabb hatóanyagforrások a gyógyszeripar számára. Az újonnan felfedezett cianobakteriális metabolitokat azonban egyre nagyobb érdeklődés övezi, és a fotoszintetizáló mikroorganizmusok gyógyászati jelentősége is átértékelődik [2].

Munkánk során különböző cianobaktérium fajok peptid metabolit termelő képességét kívántuk vizsgálni LC-ESI-MS/MS módszerrel. A vizsgálatok során a cianobaktériumok toxin-tartalom kimutatására alkalmazott megközelítéseken túl a ritkán vizsgált peptidek megjelenésére összpontosítottunk. Egyik célunk a Balatonban 2013 és 2016 között megfigyelhető *Microcystis* fajok azonosítása, peptid metabolom elemzése és eddig azonosítatlan peptid metabolitok aminosav szintű karakterizálása,

valamint a metabolitok előfordulása alapján létrehozható kemotípusok meghatározása után azok térbeli és időbeli eloszlásának vizsgálata volt. Hasonló módon szeretnénk volna megvizsgálni az Alföld alkalikus gyeptársulásain szabadon előforduló szárazföldi, illetve egyes zuzmó eredetű endoszimbionta *Nostoc* fajok peptid termelő képességét. Az egyes kemotípusok térbeli eloszlásának vizsgálatán túl célunk volt a szabadon élő és szimbionta törzsek genotípusainak és kemotípusaink összehasonlítása is. Végül pedig a potens biológiailag aktív peptid molekulák azonosításán és jellemzésén keresztül kívántuk felhívni a figyelmet a cianobaktériumokra, mint természetes hatóanyagforrásokra.

II. ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

A Balatonból származó vízmintákat nitrát tartalmú Allen tápoldattal kevertük és 5 napig inkubáltuk, majd a látható *Microcystis* kolóniákat összegyűjtöttük és a továbbiakban ezeket nitrát tartalmú tápoldatban, 26 °C-on, állandó megvilágítás mellett tenyésztettük. Az Alföld különböző részeiről (13 puszta) gyűjtött szárazföldi cianobaktérium mintákat 3 ismétlésben steril vízzel alaposan lemostuk, majd nitrát mentes Allen tápoldatba helyeztük és 26 °C-on, állandó megvilágítás mellett inkubáltuk. Egy hét elteltével a mintákat 1,5% agarral szilárdított nitrát mentes Allen táptalajra szélesztettük és további egy hétig inkubáltuk őket. A morfológiailag különböző, különálló kolóniákat nitrát mentes Allen tápoldatot tartalmazó 96 lyukú mikrotiter lemezekre vittük át, majd egymást követő 3 alkalommal újra kiszélesztettük őket. Az *Azolla* sp. és zuzmó szimbionta sejtvonalak izolálása során felületi sterilizációval (10%-os hypo) távolítottuk el a felszínen lévő mikroorganizmusokat. A zuzmó minták esetében a letisztított telepeket 1,5%-

os agarral szilárdított nitrát mentes Allen táptalajra helyeztük, és a telepek peremén megjelenő cianobaktérium kolóniákat nitrát mentes Allen tápoldatban neveltük tovább. Az *Azolla* sp. növényeket steril dörzsmozsárban szikével apróra vágtuk, tápoldatban homogenizáltuk és szűrtük. A szűrleményt óvatosan centrifugáltuk és a pelletet egyre növekvő fényintenzitás valamint tápoldat erősség mellett inkubáltuk.

A tápoldatban nevelt cianobaktérium sejteket centrifugálással gyűjtöttük össze és fagyasztva szárítottuk, majd 80%-os metanollal extraháltuk. A kivonatokat HPLC-ESI-MS/MS módszerrel vizsgáltuk. A minták komponenseit Kinetex XB-C18 oszlopon (100 mm X 2,1 mm X 2,6 µm) választottuk szét víz - acetonitril gradiens segítségével. Az MS mérés pozitív ion módban történt. Az egyes metabolitok azonosítása MS/MS fragmentációs mintázatok alapján irodalmi adatok felhasználásával történt [3,4]. Az azonosított peptideket célzott csúskereséssel integráltuk, a nyers abundancia adatokat szűrtük és log10 transzformáltuk. Az adatkészletet Minkowski illetve Canberra távolság alapján Ward-módszerrel hierarchikusan csoportosítottuk. A kémiai mintázat és egyéb változók (származási hely, taxonómiai helyzet) statisztikai teszteléséhez fő komponens analízis értékeit Kruskal - Wallis szignifikancia tesztnek vetettük alá.

A filogenetikai vizsgálatokhoz fenol-kloroformos módszerrel DNS kivonatokat készítettünk. A DNS kivonatok koncentrációját és tisztaságát spektrofotometriás módszerrel határoztuk meg. A *Microcystis* sejtvonalak közötti filogenetikai kapcsolatok vizsgálatát a 16-23S ITS régió, *Nostoc* sejtvonalak esetében 16S rRNS gén szekvencia analízisén keresztül vizsgáltuk. A PCR termékeket 1%-os agaróz gélen ellenőriztük és UV fény segítségével detektáltuk. A termékeket tisztítottuk és Sanger-szekvenálással elemeztük. A

kapott szekvenciákat ellenőriztük és szükség esetén javítottuk, majd hasonlósági kereséseket és filogenetikai analízist végeztünk.

Az ujjlenyomat-elemzéshez STRR (short tandemly repeated repetitive) és ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus) szekvenciáknak megfelelő primerek felhasználásával PCR reakciókat raktunk össze. Az amplifikált DNS fragmenteket 1%-os agaróz gélen választottuk el és a kapott mintázatokat szoftveresen elemeztük.

III. EREDMÉNYEK ÉS JELENTŐSÉGÜK

A Balatonból származó sejtvonalaink morfológiai és filogenetikai alapon a *Microcystis flos-aquae* fajhoz mutattak legnagyobb hasonlóságot. A 25 nyíltvízi *Microcystis* izolátum és a 3 vízvirágzást alkotó *Microcystis* közösség peptid metabolit vizsgálata során 36 anabaenopeptin, 17 microginin és 13 microcystin variánst azonosítottunk. A peptidek között szerepel 32 anabaenopeptin és 15 microginin változat is, melyek eddig ismeretlenek voltak. A sejtvonalak jellemzően fő komponensként vagy anabaenopeptin vagy microginin vagy microcystin variánsokat tartalmaztak, melyek mellett szignifikánsan kisebb mennyiségben előfordulhattak más típusú peptidek. A vízmintákból elsősorban anabaenopeptin és microginin domináns törzseket izoláltunk, de 10 törzs esetében microcystinek is előfordultak. Két sejtvonal kiemelkedő mennyiségben termelt microcystineket. Az egyes kemotípusok között nem találtunk filogenetikai kapcsolatot és nem volt szignifikáns összefüggés a metabolit mintázatok és a minták származása között sem. A három egymás utáni évből származó, azonos mintavevő helyről vett vízvirágzás minták különböző bioaktív peptid mintázatokat mutattak.

Az Alföldről begyűjtött 65 száraz terepi mintából 133 izolátumot sikerült létrehozni, melyeknek 90%-a a *Nostoc* nemzetségbe tartozott, azonban filogenetikai alapon elkülönültek a *Nostoc*, *Aliinostoc* és *Desmonostoc* referencia törzsektől. Az STRR és az ERIC ujjlenyomat vizsgálatok szintén különbségeket mutattak az izolált törzsek között, de ezek nem voltak összefüggésben a filogenetikai elemzés eredményével. Az izolált sejtvonalak valamivel több, mint egyharmada termelt valamilyen peptid típusú metabolitot. Méréseink során 12 nostoginin/microginin, 16 anabaenopeptin, 12 banyaside/suomilide és 1 nostopeptolide variánst találtunk az izolátumaink kivonataiban. Az azonosított metabolitok között szerepel 10 új nostoginin/microginin, 7 új anabaenopeptin és 9 új banyaside/suomilide változat is. Az izolált sejtvonalak többsége csak és kizárólag egy típusba tartozó peptideket termeltek, de akadtak olyanok is, melyek mind anabaenopeptin mind banyaside típusú metabolitokat egyaránt termeltek. Nem találtunk összefüggéseket az egyes kemotípusok és genotípusok között. Az STRR és az ERIC DNS-ujjlenyomat eredmények szintén nem mutattak szigorú korrelációt sem a törzsek eredetével, sem a termelt peptid metabolitokkal, viszont az anabaenopeptin termelő törzsek többsége külön csoportot alkotott.

A szimbionta *Nostoc* sejtvonalaink molekuláris alapon rokonságban állnak a *Nostoc*, *Aliinostoc* és *Desmonostoc* nemzetséggel, de külön csoportot alkotnak. Egyes sejtvonalak közeli kapcsolatban állnak főként anabaenopeptin és banyaside termelő szárazföldi *Nostoc* törzsek csoportjával. A zuzmó eredetű sejtvonalak nem termeltek semmilyen peptid típusú speciális metabolitot, de az *Azolla* sp. szimbionta sejtvonal képes volt banyaside variánst (a szárazföldi törzsekhez hasonló mértékben) előállítani.

A két cianobaktérium nemzettség tagjai által termelt peptid metabolitok gyógyászati és egészségügyi szempontból egyaránt jelentősek. A microcystinek a leggyakoribb természetes vizekben előforduló cianobakteriális toxinok, egyaránt veszélyesek emberekre, állatokra és növényi szervezetekre. A nostogininek és a microgininek cink-metalloproteáz gátlók, valamint aminoproteinázok gátlószerei. Az angiotenzin-konvertáló enzimre gyakorolt gátló hatásuk miatt ezek az anyagok fontos jelöltek lehetnek akár a magas vérnyomás kezelésében. Az anabaenopeptinek különböző hatásokkal bírhatnak, leggyakrabban a proteináz enzimek, például tripszin, kimotripszin, elasztáz és karboxipeptidáz működését gátolják. Egyes variánsok protein foszfatázok inhibitorai. A korábban is ismert banyasidok/suomilidek proteáz (tripszin és trombin) gátlóknak bizonyultak, azonban előzetes vizsgálataink során banyaside tartalmú kivonatok gátolták az angiotenzin-konvertáz enzim működését. Egyes nostopeptolide variánsokat antitoxinként tartanak számon, gátolják a microcystinek felvételéért felelős aniontranszporterek működését [5,6].

IV. FELHASZNÁLT IRODALOM

- [1] Whitton, B.A., Ed. *Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time.*; Springer: Dordrecht/Heidelberg/New York/London, 2012.
- [2] Rastogi, R.P.; Sinha, R.P. Biotechnological and Industrial Significance of Cyanobacterial Secondary Metabolites. *Biotechnology Advances* **2009**, *27*, 521-539.
- [3] Welker, M.; von Döhren, H. Cyanobacterial Peptides - Nature's Own Combinatorial Biosynthesis. *FEMS Microbiol. Lett.* **2006**, *30*, 530-563.
- [4] Mayumi, T.; Kato, H.; Kawasaki, Y.; Harada, K. Formation of Diagnostic Product Ions from Cyanobacterial Cyclic Peptides by the Two-Bond Fission Mechanism using Ion Trap Liquid Chromatography/Multi-Stage Mass Spectrometry. *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.* **2007**, *21*, 1025-1033.
- [5] Meriluoto, J.; Spoof, L.; Codd, G.A., Eds. *Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis.*; John Wiley & Sons, Inc.: Chichester, West Sussex, UK, 2016.
- [6] Liu, L.; Jokela, J.; Herfindal, L.; Wahlsten, M.; Sinkkonen, J.; Permi, P.; Fewer, D.P.; Doskeland, S.O.; Sivonen, K. 4-Methylproline Guided Natural Product Discovery: Co-Occurrence of 4-Hydroxy- and 4-Methylprolines in Nostoweipeptins and Nostopeptolides. *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 2646-2655.



Nyilvántartási szám: DEENK/49/2020.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Riba Milán
Neptun kód: DHFKMF
Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10044557

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Riba, M.**, Kiss-Szikszai, A., Gonda, S., Parizsa, P., Deák, B., Török, P., Valkó, O., Felföldi, T., Vasas, G.: Chemotyping of terrestrial Nostoc-like isolates from alkali grassland areas by non-targeted peptide analysis.
Algal Res. 46, 1-18, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2020.101798>
IF: 3.723 (2018)
2. **Riba, M.**, Kiss-Szikszai, A., Gonda, S., Boros, G., Vitál, Z., Borsodi, A., Krett, G., Borics, G., Ujvárosi, A. Z., Vasas, G.: Microcystis Chemotype Diversity in the Alimentary Tract of Bigheaded Carp.
Toxins. 11 (5), 1-27, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/toxins11050288>
IF: 3.895 (2018)

További közlemények

3. Ujvárosi, A. Z., Herczeg, K., **Riba, M.**, Gonda, S., Filipič, M., Vasas, G., Žegura, B.: The cyanobacterial oligopeptides microginins induce DNA damage in the human hepatocellular carcinoma (HepG2) cell line.
Chemosphere. 240, 1-11, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124880>
IF: 5.108 (2018)
4. Ujvárosi, A. Z., **Riba, M.**, Garda, T., Gyémánt, G., Vereb, G., Mikóné Hamvas, M., Vasas, G., Máthé, C.: Attack of Microcystis aeruginosa bloom on a Ceratophyllum submersum field. Ecotoxicological measurements in real environment with real microcystin exposure.
Sci. Total Environ. 662, 735-745, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.226>
IF: 5.589 (2018)





5. Sonkoly, J., Valkó, O., Deák, B., Migléc, T., Tóth, K., Radócz, S., Kelemen, A., **Riba, M.**, Vasas, G., Tóthmérész, B., Török, P.: A new aspect of grassland vegetation dynamics: cyanobacterium colonies affect establishment success of plants.
J. Veg. Sci. 28 (3), 475-483, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/jvs.12503>
IF: 2.658
6. Garda, T., Kónya, Z., Tándor, I., Beyer, D., Vasas, G., Erdődi, F., Vereb, G., Papp, G., **Riba, M.**, Mikóné Hamvas, M., Máthé, C.: Microcystin-LR induces mitotic spindle assembly disorders in *Vicia faba* by protein phosphatase inhibition and not reactive oxygen species induction.
J. Plant Physiol. 199, 1-11, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2016.04.009>
IF: 3.121
7. **Riba, M.**, Borsodi, A., Ujvárosi, A. Z., Vasas, G.: Microcystis izolátumok peptid-variabilitás vizsgálata.
Hidrol. Közöny. 96 (ksz.), 79-82, 2016.
8. Garda, T., **Riba, M.**, Vasas, G., Beyer, D., Mikóné Hamvas, M., Hajdu, G., Tándor, I., Máthé, C.: Cytotoxic effects of cylindrospermopsin in mitotic and non-mitotic *Vicia faba* cells.
Chemosphere. 120, 145-153, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.06.035>
IF: 3.698
9. Máthé, C., Demeter, Z., Resetár, A., Gonda, S., Balázs, A., Szőke, É., Kiss, Z., Simon, Á., Székely, V., **Riba, M.**, Garda, T., Gere, B., Noszály, Z., Molnár, V. A., Vasas, G.: The plant tissue culture collection at the Department of Botany, University of Debrecen.
Acta biol. Szeged. 56 (2), 179-182, 2012.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 27,792

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
7,618

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2020.02.28.

