

ΕΙΔΙΚΑ ΜΑΘΗΜΑΤΑ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗΣ
ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Σύγχρονες μέθοδοι ανάλυσης μικροβιωμάτων
Ομικές τεχνικές: λειτουργία και ρόλος
μικροοργανισμών στο περιβάλλον

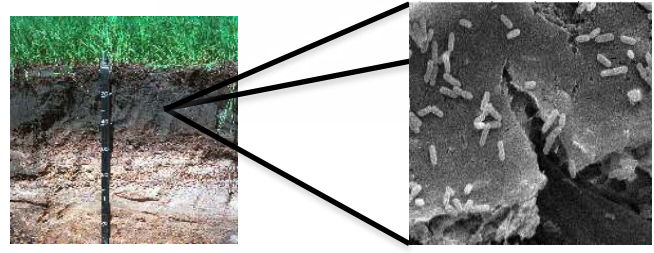
Επιμέλεια

Βασιλειάδης Σωτήριος

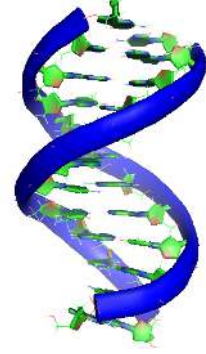
(Ομάδα Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος)



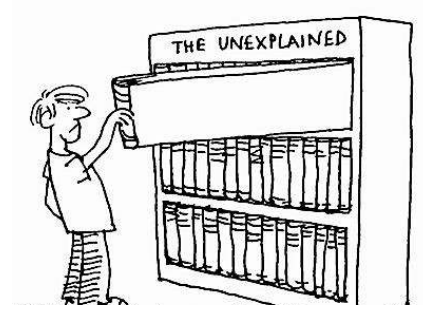
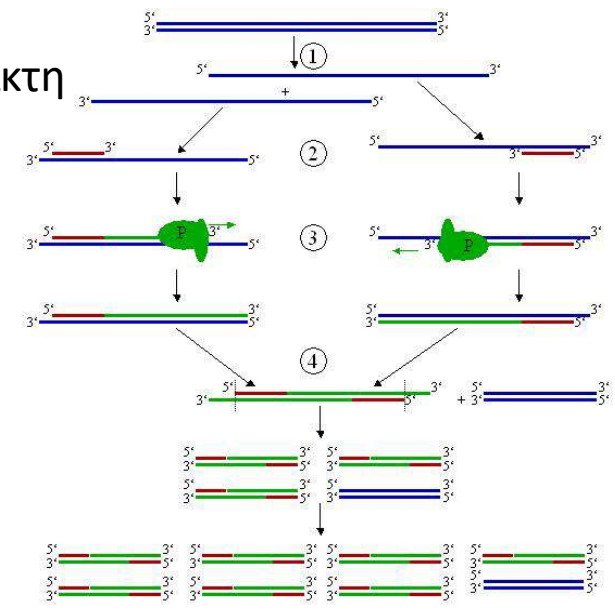
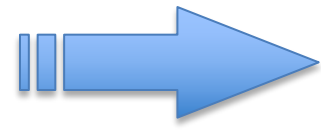
Μικροβιακή ποικιλότητα με NGS με μια ματιά



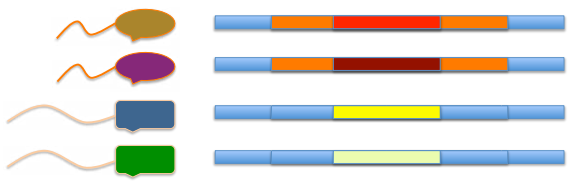
1. Δειγματοληψία και εκχύλιση νουκλεϊκών οξέων



2. Επιλογή και PCR ενίσχυση φυλογενετικού δείκτη



Ταξινομικές μονάδες



4. Ανάλυση δεδομένων



3. Αλληλούχιση



ΤΜΗΜΑ

Βιοχημείας &
Βιοτεχνολογίας
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Λειτουργία μικροοργανισμών

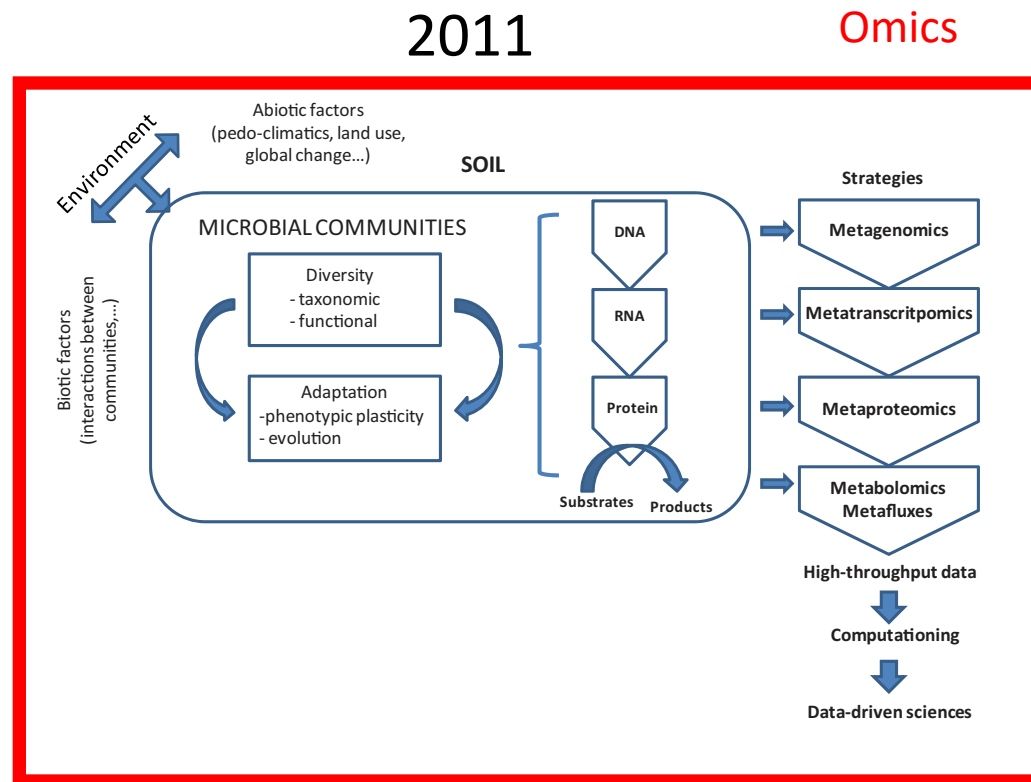
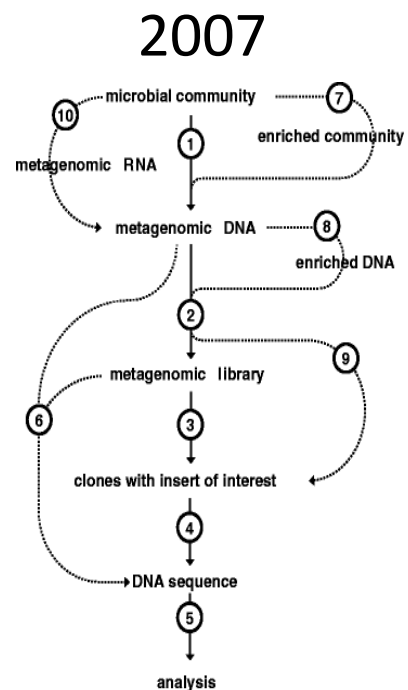
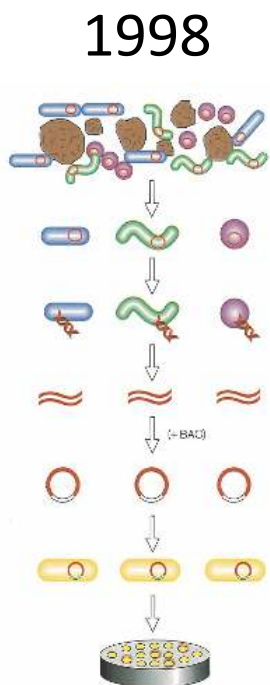
- Κύκλοι θρεπτικών
- Επίδραση σε αύξηση/ανάπτυξη φυτών ζώων
- Απορρύπανση στο πεδίο
- Βιο-έλεγχος παθογόνων, πηγή αντιβιοτικών, ενζύμων
- ...



Η **ταυτότητα** των μικροοργανισμών **μπορεί** να δώσει πληροφορίες για τη λειτουργία τους, **όμως** όπου είναι δυνατό **βασίζόμαστε** στην **παρουσία και έκφραση ομολόγων γονιδίων** καθώς και στην παρουσία **μεταβολιτών**



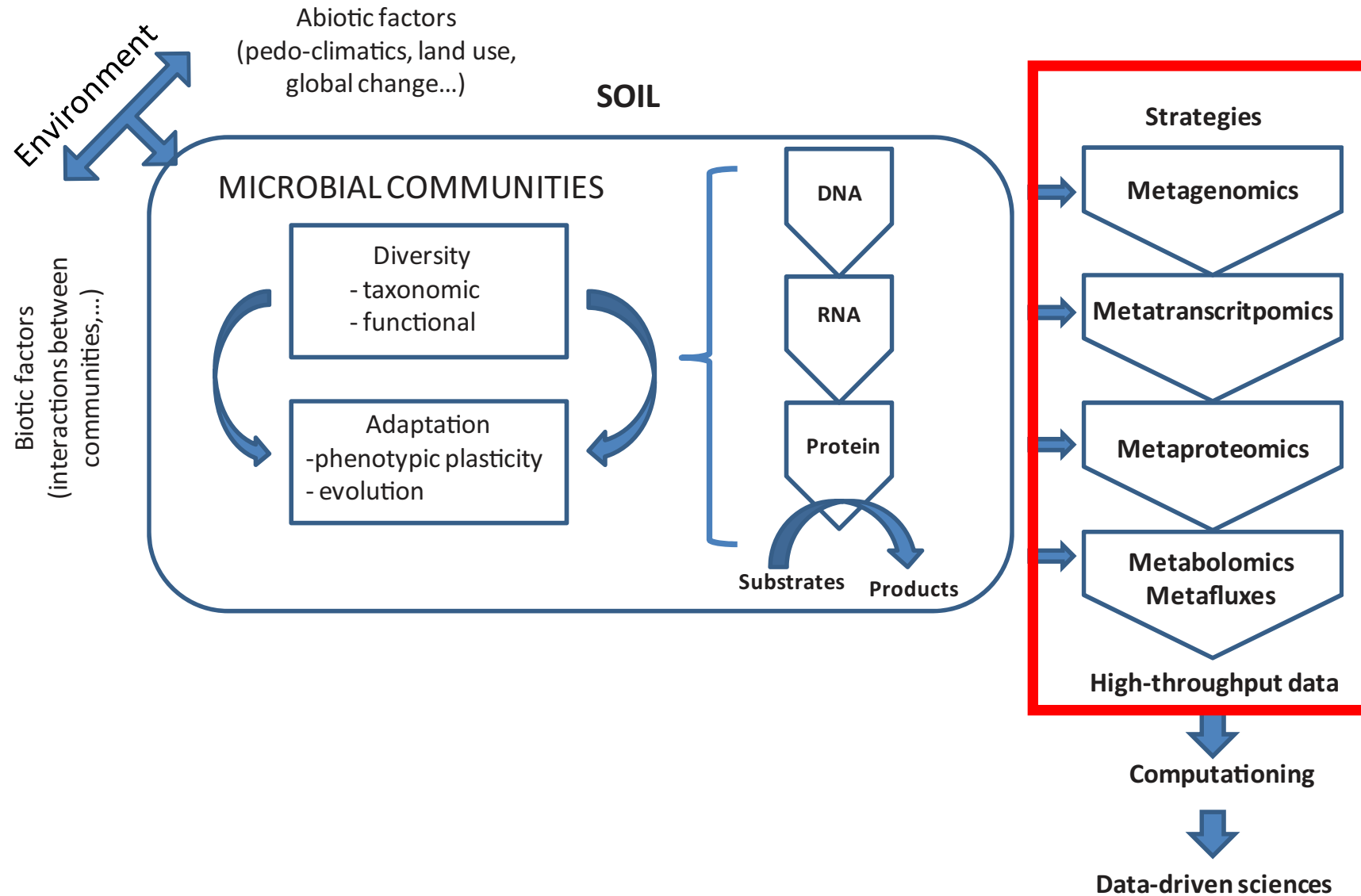
Μέθοδοι ελεύθερες καλλιέργειας



Μεταγονιδιωματική

“Η ανάλυση σε επίπεδο λειτουργίας και σύνθεσης αλληλουχιών DNA του συνόλου των γονιδιωμάτων περιβαλλοντικών δειγμάτων”

Ομικές μέθοδοι ανάλυσης





Ομικές μέθοδοι ανάλυσης

- Ομικές μέθοδοι: δίνουν τη δυνατότητα **ολιστικών** προσεγγίσεων και αναλύσεων σε επίπεδα **βιολογίας συστημάτων**
- Μία ολοκληρωμένη προσέγγιση περιέχει:
 1. Μεταγονιδιωματική: ανάλυση γονιδίων ενός περιβαλλοντικού δείγματος (ΠΔ)
 2. Μετα-μεταγραφωματική: ανάλυση της μεταγραφής των γονιδίων ενός ΠΔ
 3. Μεταπρωτεομική: ανάλυση της μετάφρασης των μεταγράφων ενός ΠΔ
 4. Μεταβολομική: ανάλυση του συνόλου των μεταβολιτών ενός ΠΔ
- Κοινός στόχος: η ανάλυση του συνόλου των βιομορίων στόχων κάθε μεθόδου
- Κοινό πρόβλημα: σχεδόν ποτέ δεν είναι εφικτή η ανάλυση του συνόλου των βιομορίων στόχων **λόγω ποικιλότητας και τάξης μεγεθών**

Εκχύλιση/παραλαβή βιομορίων



ΤΜΗΜΑ

Βιοχημείας &
Βιοτεχνολογίας

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

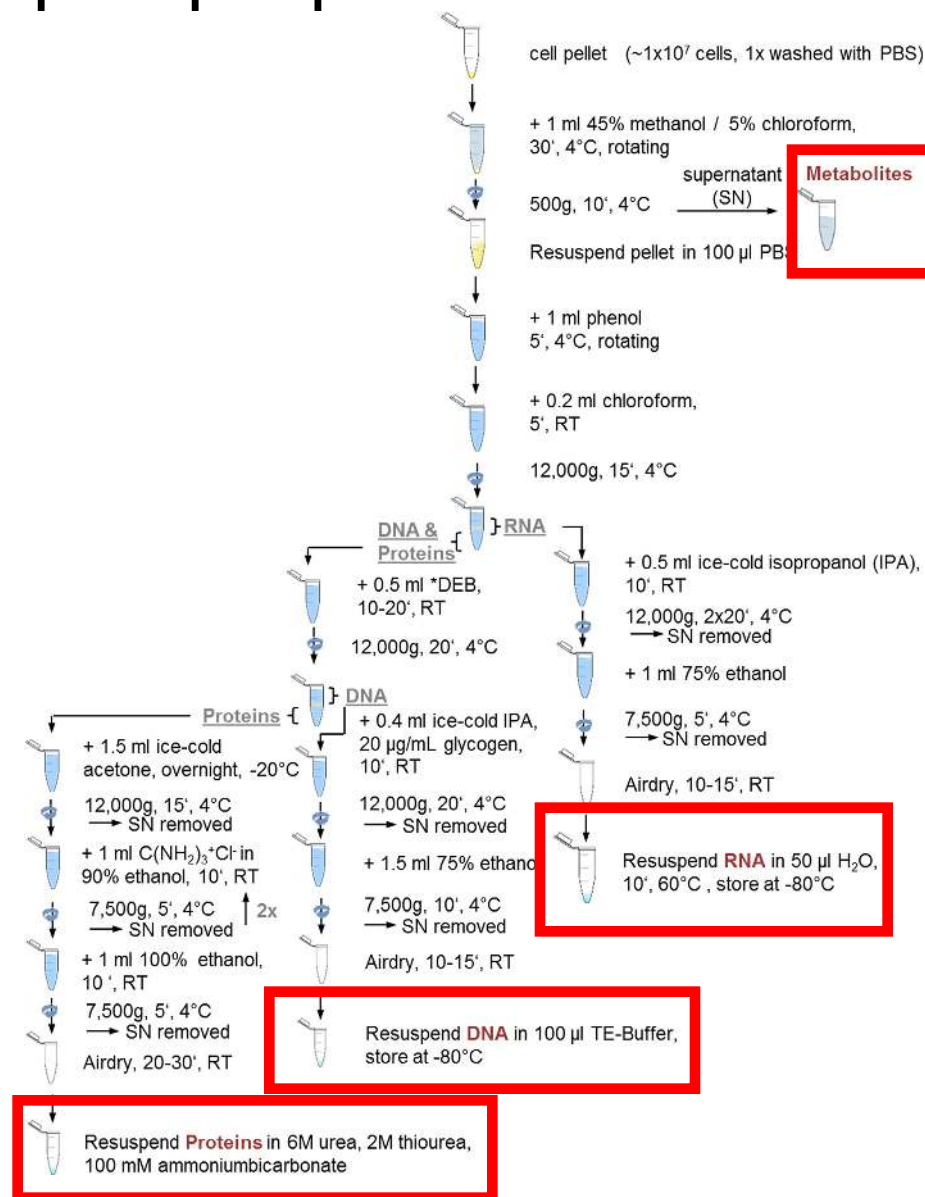
Εκχύλιση/παραλαβή βιομορίων

- Τα βιομόρια ενδιαφέροντος μπορεί να είναι εξωκυτταρικά (πρωτεΐνες, μεταβολίτες) ή ενδοκυτταρικά (όλες οι ομάδες)
- Τυπική προσέγγιση παραλαβής εξωκυτταρικών βιομορίων
 - Φυγοκέντριση
 - Λήψη υπερκείμενου ή εξαγνισμός με κατακρήμνιση
- Μπορούμε να παραλάβουμε μία ανά δείγμα ή και όλες τις ομάδες μαζί



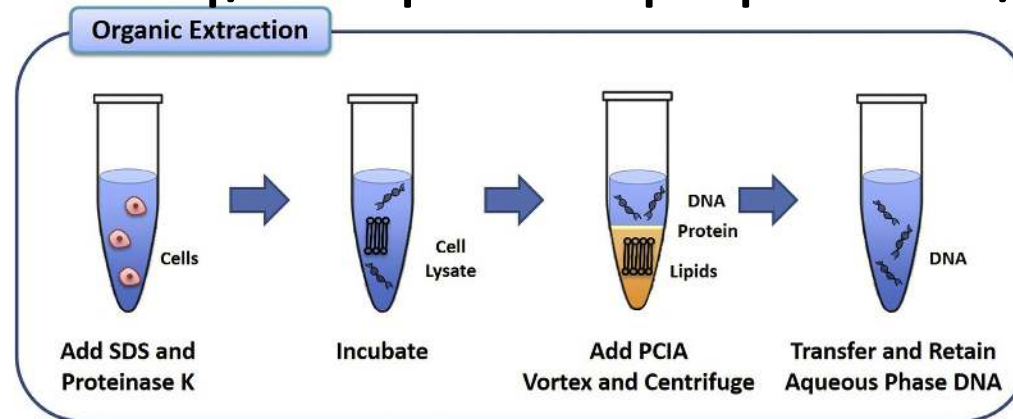
Εκχύλιση/παραλαβή βιομορίων

Π.χ. εκχύλιση/παραλαβή των τεσσάρων ομάδων βιομορίων μαζί (εξωκυτταρικών/ενδοκυτταρικών)





Εκχύλιση/παραλαβή DNA/RNA



- Καταστροφή μεμβρανών και προστασία νουκλεϊκών οξέων
 - **Μηχανικά** (σφαιρίδια και μηχανήματα ισχυρής ανάδευσης/κρούσης)
 - **Ένζυμα**
 - Π.χ. **λυσοζύμη** για καταστροφή τοιχωμάτων Gram+
 - Π.χ. **πρωτεϊνάση K** για γενική πέψη πρωτεϊνών (σπάει δεσμούς πλησίον της καρβοξυομάδας των αλειφατικών και αρωματικών αμινοξέων) προς καταστροφή μεμβρανικών πρωτεϊνών και **κυρίως αναστολή δράσης νουκλεασών**
- **Επιφανειοδραστικές/αποδιατακτικές**
 - π.χ. **sodium dodecyl sulfate – SDS**:
 - δρα ως αποδιατακτική των πρωτεϊνών, όπως και το θειοκυανικό γουανίδιο
 - καταστρέφει μεμβράνες (επιφανειοδραστική)



Εκχύλιση/παραλαβή DNA/RNA

- Διαχωρισμός νουκλεϊκών οξέων από λοιπές οργανικές ουσίες
 - Διαχωρισμός από οργανική φάση σε εκχυλίσιμες π.χ. φαινόλη:χλωροφόρμιο:ισοαμυλική αλκοόλη (25:24:1)
 - Υδάτινη φάση: νουκλεϊκά οξέα
 - Οργανική φάση: υδρόφοβες ουσίες
- Κατακρήμνιση νουκλεϊκών οξέων
 - Με ρύθμιση pH:
 - Χαμηλό pH (4) -> RNA
 - Υψηλό pH (8) -> DNA
 - Χαοτροπικοί παράγοντες (καταστρέφουν δεσμούς υδρογόνου και δημιουργούν συνθήκες κατακρήμνισης/πρόσδεσης σε στήλες Si του DNA: αιθανόλη, ισοπροπανόλη, άλατα)
- Έκλουση με H₂O από στήλες



ΤΜΗΜΑ

Βιοχημείας &
Βιοτεχνολογίας
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Εκχύλιση πρωτεϊνών/μεταβολιτών

- Παραλαβή εξωκυττάρων βιομορίων με φυγοκέντριση
- Παραλαβή ολικών βιομορίων
 - Καταστροφή κυτταρικών τοιχωμάτων/μεμβρανών με μηχανική λύση
 - Κύκλοι πήξης/τήξης
 - Λουτρό υπερήχων
 - Μέθοδοι ομογενοποιητών υψηλής πίεσης (π.χ. French press)
 - Επιφανειοδραστικές ουσίες (π.χ. SDS, Triton X)
 - Ένζυμα
- Για κατακρήμνιση και αδρανοποίηση πρωτεϊνών
 - Χρήση αποδιατακτικού παράγοντα (π.χ. SDS)
 - Χρήση αναγωγικού παράγοντα για διάσπαση δισουλφιδικών γεφυρών (π.χ. DTT)
 - Χρήση αλκυλιωτικού παράγοντα για σταθεροποίηση της αποδιάταξης (π.χ. IAA)
 - Μεταχείριση με πεπτικά ένζυμα (π.χ. τριψίνη) για διάσπαση πεπτιδίων

1. Μεταγονιδιωματική



ΤΜΗΜΑ

Βιοχημείας &
Βιοτεχνολογίας

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

1. Μεταγονιδιωματική

Βασικά βήματα:

- A. Εκχύλιση δεοξυριβονουκλεϊκών οξέων (αναφέρθηκε παραπάνω)
- B. Αλληλούχιση
- C. Στρατηγική συναρμολόγησης
 - i. Συναρμολόγηση μεταγονιδιώματος
 - **Εξαγωγή γονιδιωμάτων από το μεταγονιδίωμα**
 - ii. Μη συναρμολόγηση μεταγονιδιώματος
- D. Χαρακτηρισμός συναρμολογημένων αλληλουχιών / αναγνωσμάτων



ΤΜΗΜΑ

Βιοχημείας &
Βιοτεχνολογίας

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

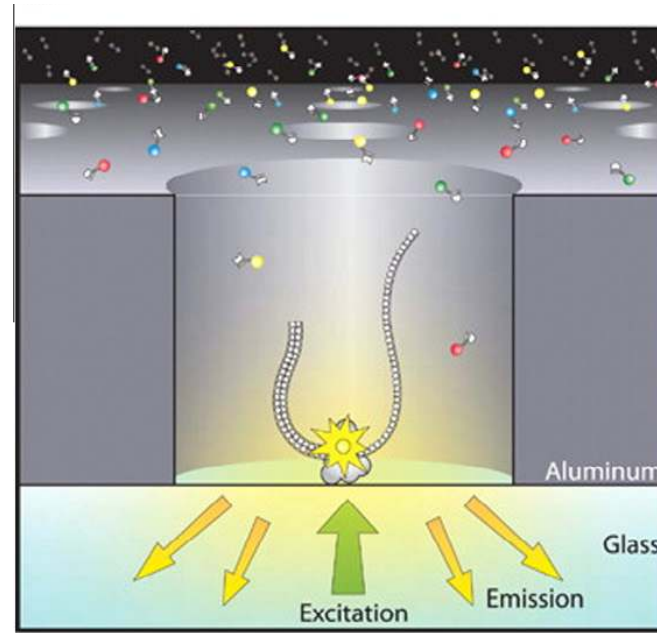
1B. Μεταγονιδιωματική (Αλληλούχιση)

Η στρατηγική αλληλούχισης είναι ανάλογη των πειραματικών στόχων

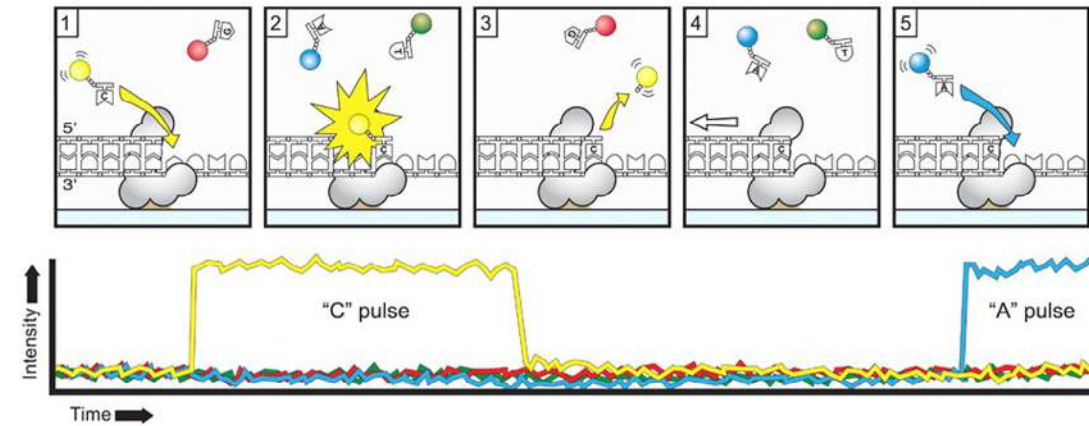
- Αν ενδιαφερόμαστε για το γονιδιακό περιεχόμενο
 - Συνήθως εφαρμογή αλληλούχισης 2^{ης} γενιάς σε μικρά βάθη αρκεί
- Αν ενδιαφερόμαστε για συναρμολόγηση (μερών) γονιδιωμάτων
 - Αλληλούχιση 2^{ης} γενιάς μεγάλου βάθους
 - Υβριδική στρατηγική αλληλούχισης: 2^{ης} και 3^{ης} γενιάς
 - Δειγματοληψία υπό διάφορες συνθήκες (3 διαφορετικές τουλάχιστο)

1B. Μεταγονιδιωματική (Αλληλούχιση 3ης γενιάς)

PacBio



Zero-Mode Waveguide (ZMW)



Μεγάλα αναγνώσματα (μ. ο. > 10 kbp)
 αλλά
 Τυχαία λάθη με πιθανότητα 15 % (InDels)

Solution

Circular consensus sequencing (CCS)
+ overlapping-based correction

DNA fragment

ligate adaptors

sequence

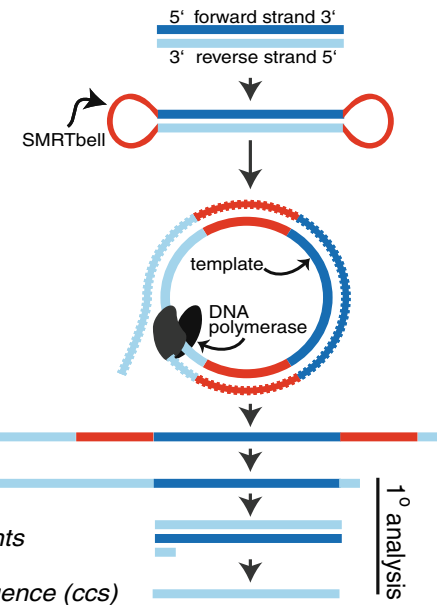
data analysis

raw long read

processed long read

single-molecule fragments

circular consensus sequence (ccs)

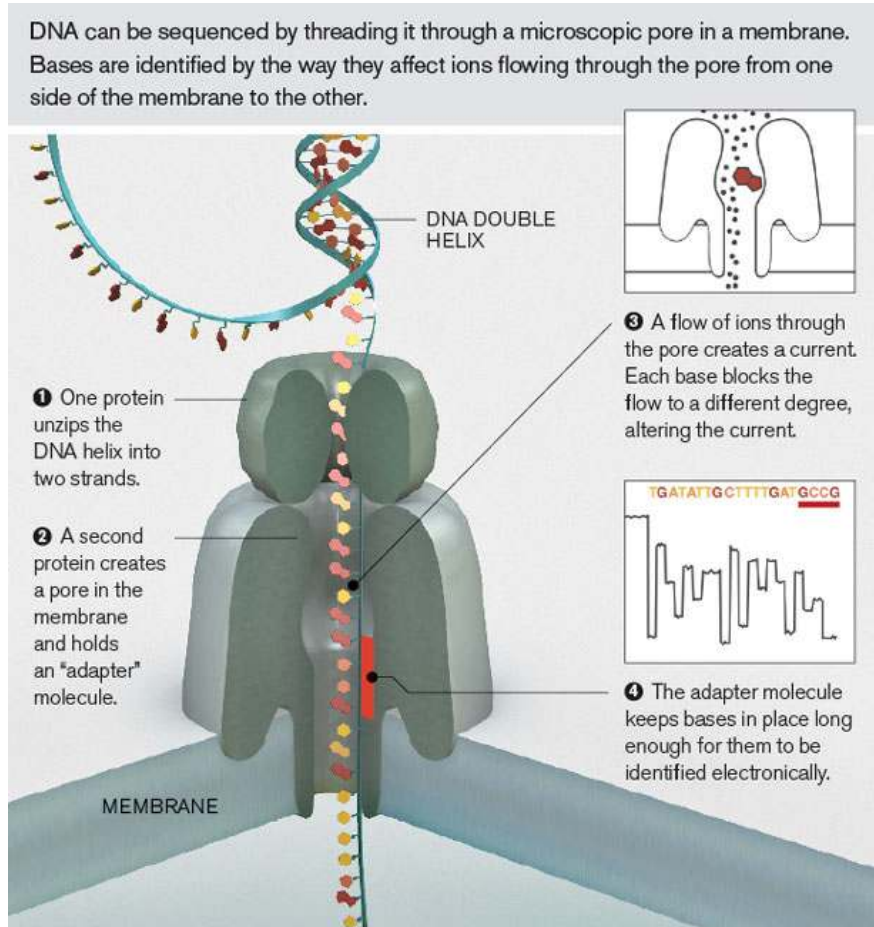


1° analysis

1B. Μεταγονιδιωματική (Αλληλούχιση 3ης γενιάς)

Nanopore

- Υψηλότερες πιθανότητες λάθους από PacBio (10-40%)
- Τύποι λάθους (InDels και substitutions)
- Ελάχιστη προετοιμασία δείγματος και παραγωγή στον πάγκο
- Πολύ μεγάλα αναγνώσματα (πιο μεγάλα από PacBio)



<https://nanoporetech.com/products/minion>

Lu, H., *et al.* (2016). Oxford Nanopore MinION Sequencing and Genome Assembly. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics* 14, 265-279

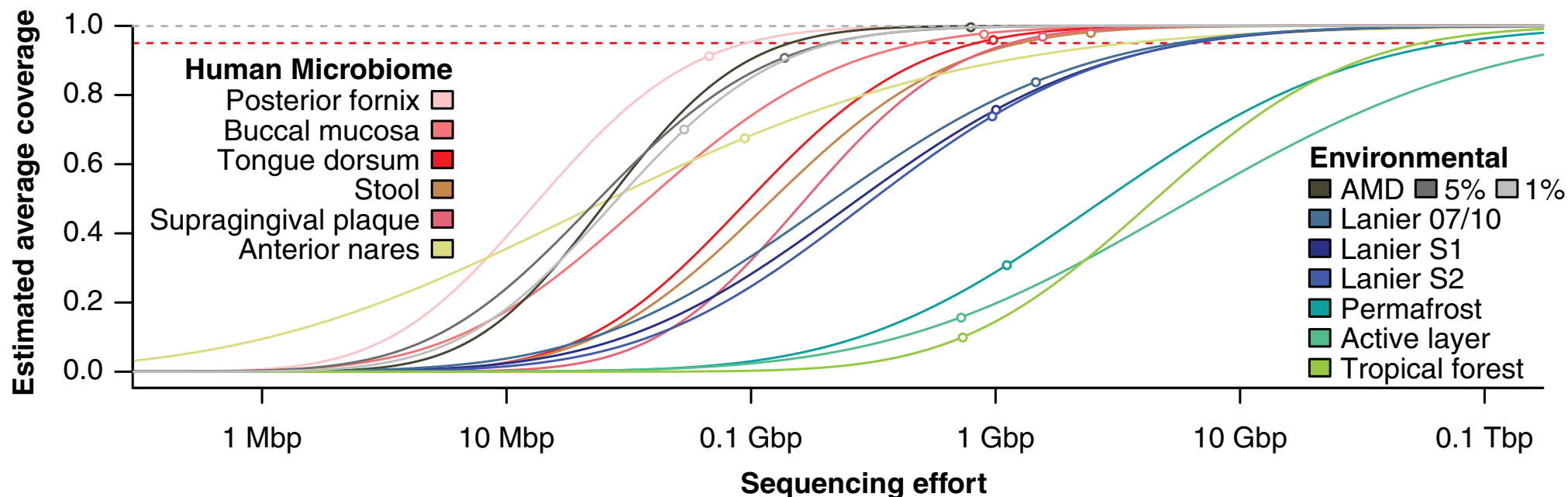
O'Donnell, C.R., *et al.* (2013). Error analysis of idealized nanopore sequencing. *Electrophoresis* 34, 2137-2144



1B. Μεταγονιδιωματική (Αλληλούχιση)

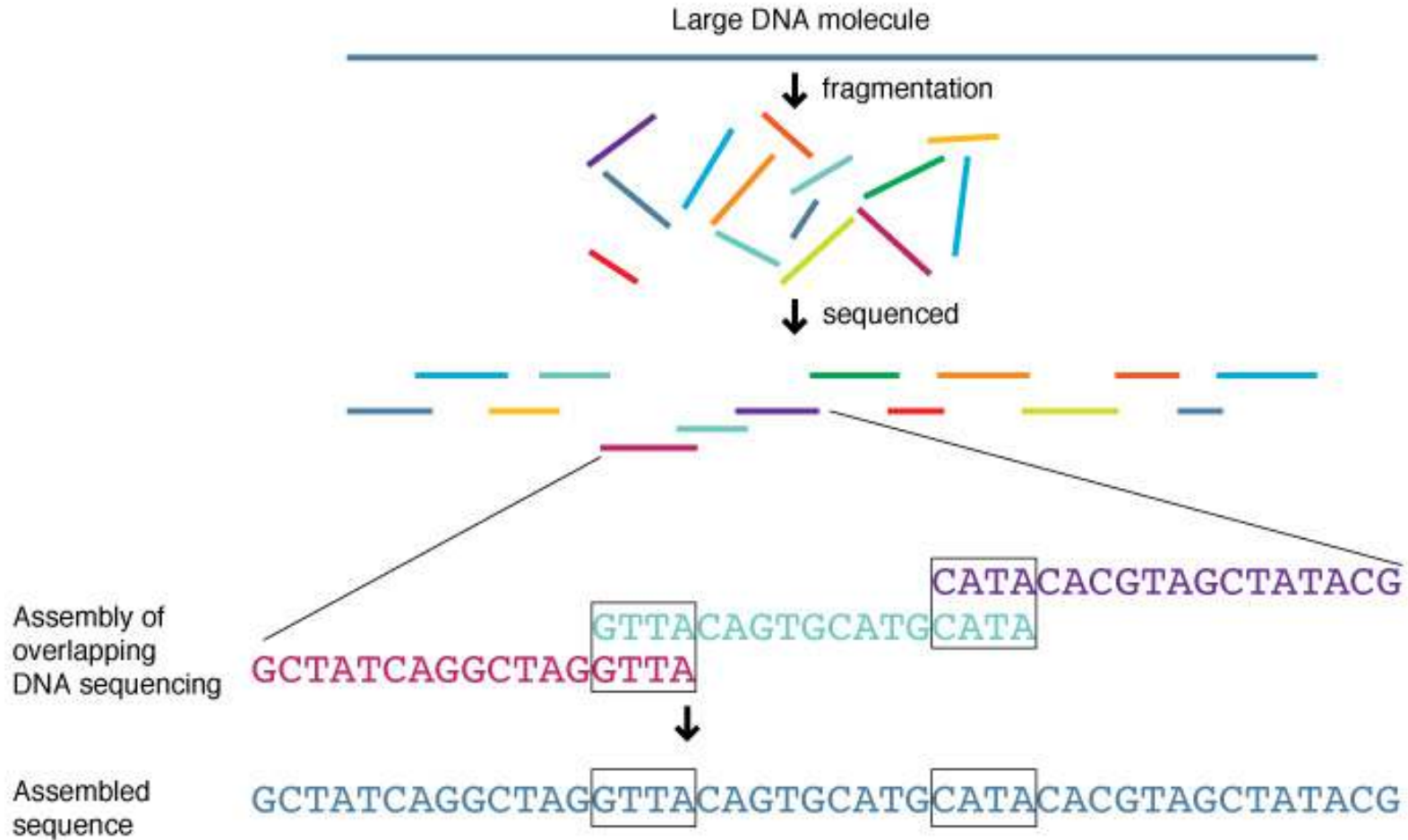
Προσδιορισμός «βάθους» (αριθμ. αναγν. βάσεων/δείγμα) αλληλούχισης:

- Διαφορετικότητα των περιβαλλόντων -> απαιτείται προπείραμα
- Ανάλυση δεικτών όπως το Nonpareil





1C. Μεταγονιδιωματική (Συναρμολόγηση)



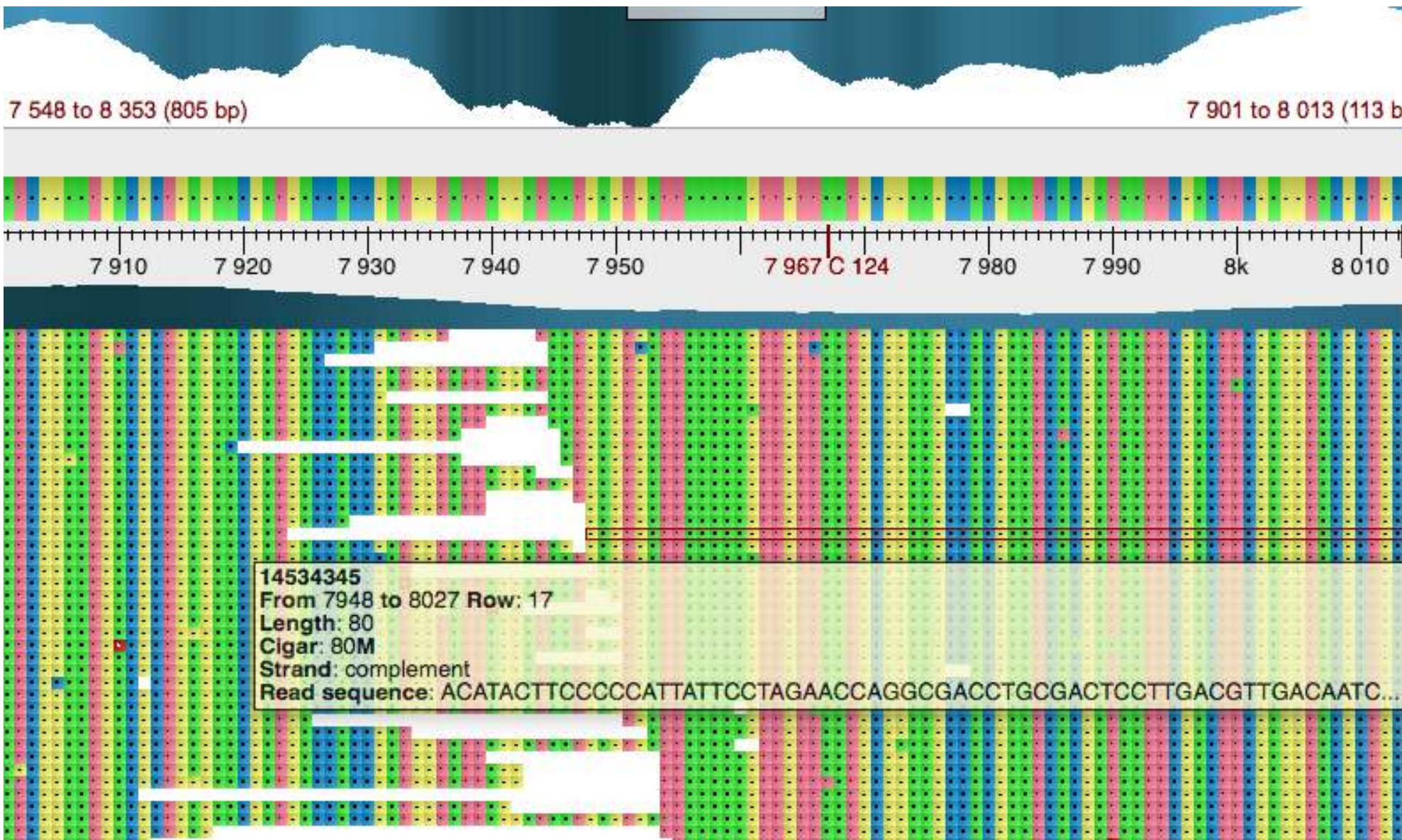


ΤΜΗΜΑ

Βιοχημείας &
Βιοτεχνολογίας

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

1C. Μεταγονιδιωματική (Συναρμολόγηση)



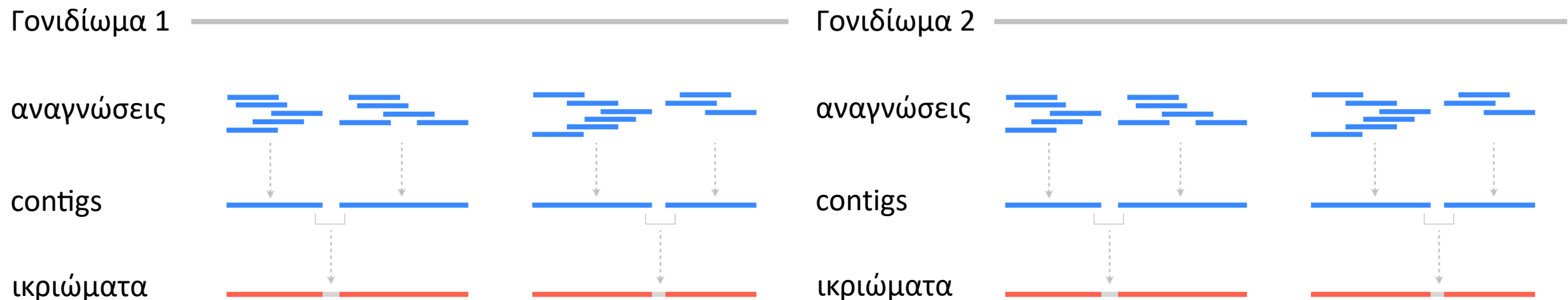
1C. Μεταγονιδιωματική (Συναρμολόγηση)

Συναρμολόγηση:

- Απλής μεθόδου αλληλούχισης (συνήθως Illumina, πιθ. λάθους 0.1%)
- Υβριδικής μεθόδου αλληλούχισης (Illumina / PacBio ή Nanopore)
 - Συναρμολόγηση με 3^{ης} γενιάς και διόρθωση λαθών με 2^{ης} γενιάς

Εκ νέου (*de novo*) ή με χρήση γονιδιωμάτων αναφοράς ή συνδυασμός

Σχηματισμός συνεχειών (contigs) αλληλουχίας



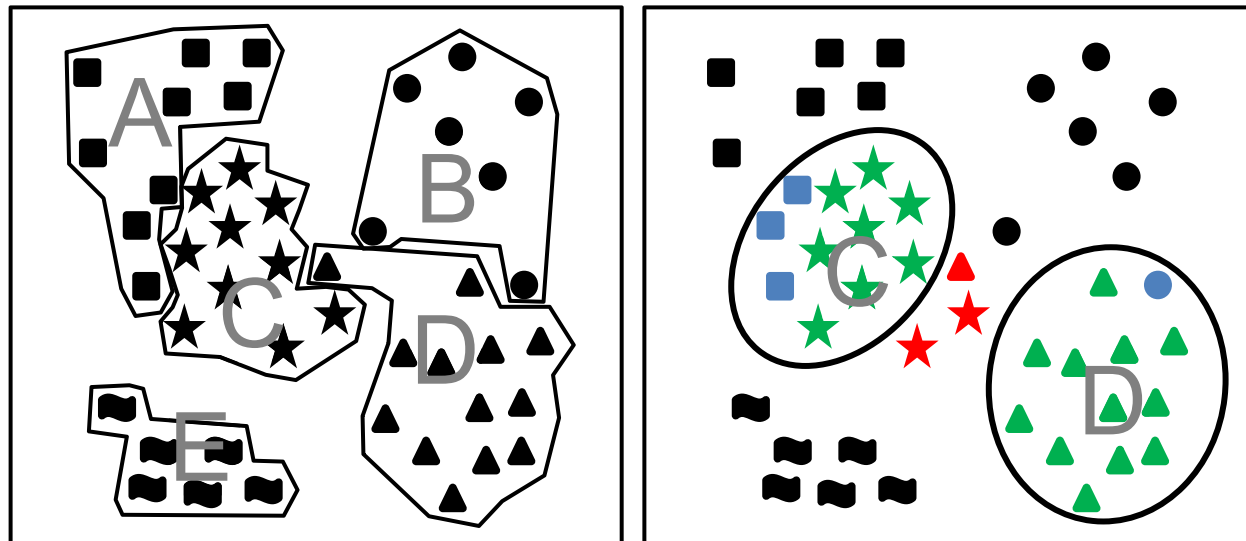
1C. Μεταγονιδιωματική (εξαγωγή γονιδιωμάτων)

Metagenome assembled genomes (MAGs)

Χαρακτηριστικά αλληλουχιών γονιδιώματος στελέχους (φυλογενετικά ο, δομικά ●):

- Στέλεχος-ειδικοί φυλογενετικοί δείκτες
- Χαρτογράφηση σε γονιδιώματα αναφοράς
- Περιεχόμενο GC
- Συχνότητες τετρανουκλεοτιδίων
- Σχετική κάλυψη contigs
- Προτίμηση κωδικονίων

- Read or contig of genome A
- Read or contig of genome B
- ★ Read or contig of genome C
- ▲ Read or contig of genome D
- ☞ Read or contig of genome E
- True positives (TP)
- False positives (FP)
- False negatives (FN)



1D. Μεταγονιδιωματική (ταξινόμηση MAGs και χαρακτηρισμός γονιδίων)

Ταξινόμηση γονιδιώματος

- Χρήση φυλογενετικών δεικτών
- Αναγνώριση τμημάτων μοναδικών ανά ταξινομική βαθμίδα

Χαρακτηρισμός γονιδίων

Δομικός χαρακτηρισμός αλληλουχιών (βάσει μοτίβων)

- Κωδικόνιο έναρξης/λήξης και σχετικές αποστάσεις
- ιντρόνια/εξόνια
- Υποκινητές
- Γονίδια που κωδικοποιούν για ncRNA (tRNA, rRNA, microRNAs, siRNAs, piRNAs, snoRNAs, snRNAs, exRNAs, scaRNAs, long ncRNAs)
- Αλληλουχίες ένθεσης (insertion sequences)
- ...

Λειτουργικός χαρακτηρισμός γονιδίων (συγκριτική γονιδιωματική)

- Στοίχιση αλληλουχιών
- Σύγκριση ανά ζεύγη (BLAST)
- Σύγκριση με προφίλ στοίχισης αλληλουχιών (αναζήτηση συντηρημένων τμημάτων)

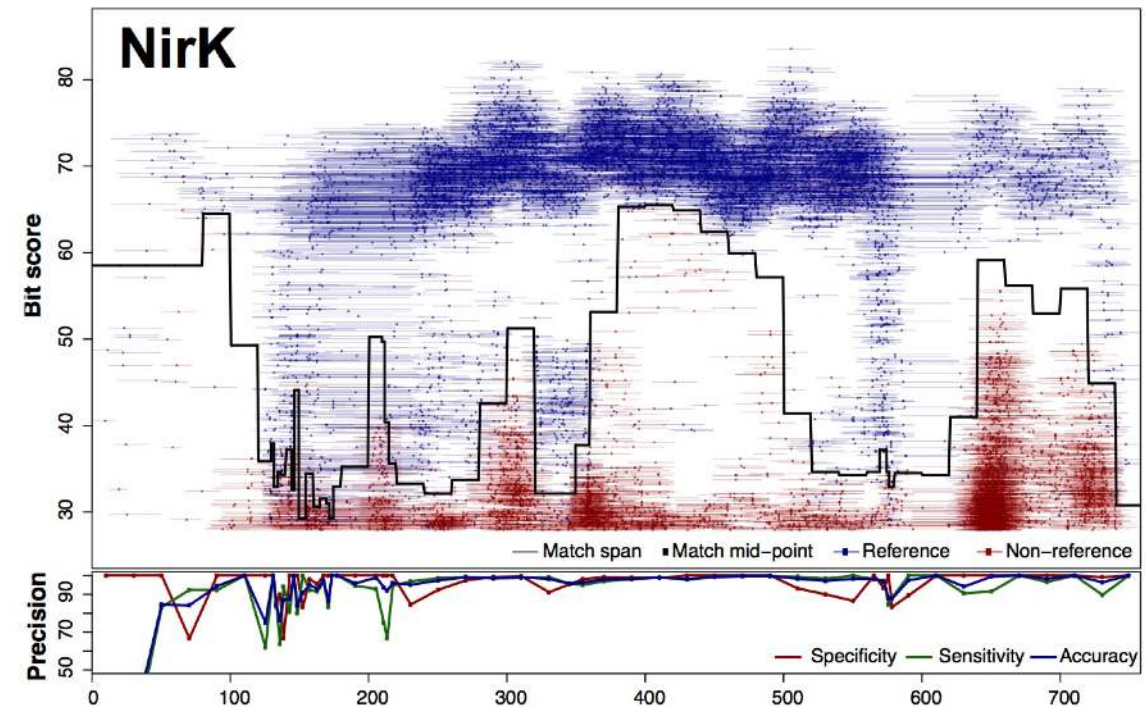
1D. Μεταγονιδιωματική (χαρακτηρισμός δίχως συναρμολόγηση)

Χαρακτηρισμός αναγνωσμάτων

- Χαρτογράφηση σε γονιδιώματα ή και γονίδια ή μοντέλα βάσεων δεδομένων ενδιαφέροντος (ταξινόμηση και λειτουργία)

Αποτίμηση βάθους ανάλυσης

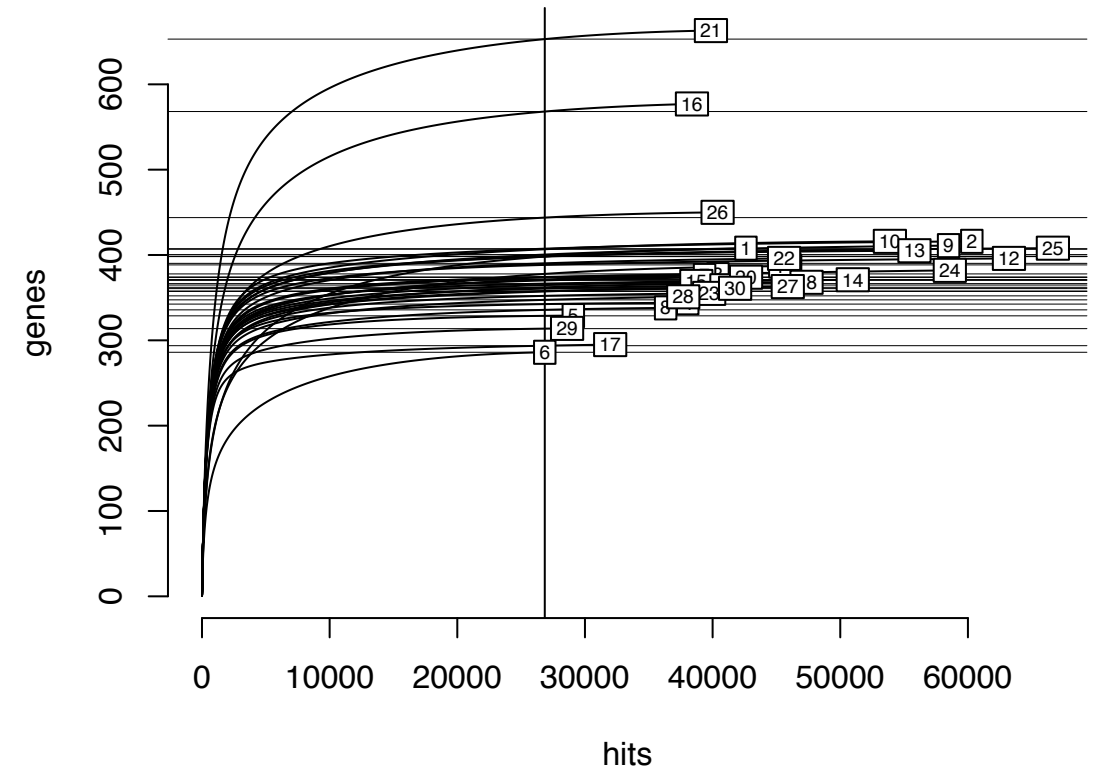
- Καμπύλες αραιώσης (rarefaction curves)
- Δείκτης κάλυψης του Good



1D. Μεταγονιδιωματική (χαρακτηρισμός δίχως συναρμολόγηση)

Χαρακτηρισμός αναγνωσμάτων

- Χαρτογράφηση σε γονιδιώματα ή και γονίδια ή μοντέλα βάσεων δεδομένων ενδιαφέροντος (ταξινόμηση και λειτουργία)
- Αποτίμηση βάθους ανάλυσης
 - Καμπύλες αραιώσης (rarefaction curves)
 - Π.χ. δείκτης εκτίμησης κάλυψης του Good



2. Μετα-μεταγραφωματική



ΤΜΗΜΑ

Βιοχημείας &
Βιοτεχνολογίας

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

2ΑΒ. Μετα-μεταγραφωματική

Βασικά βήματα:

- A. Εκχύλιση ριβονουκλεϊκών οξέων (αναφέρθηκε παραπάνω) και αντίστροφη μεταγραφή σε cDNA
- B. Αλληλούχιση
- C. Χαρτογράφηση αναγνωσμάτων ή εκ νέου συναρμολόγηση ισομορφών
- D. Συγκριτική έκφραση



ΤΜΗΜΑ

Βιοχημείας &
Βιοτεχνολογίας
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

2C. Μετα-μεταγραφωματική

Βασικά βήματα:

- A. Εκχύλιση ριβονουκλεϊκών οξέων (αναφέρθηκε παραπάνω) και αντίστροφη μεταγραφή σε cDNA
- B. Αλληλούχιση
- C. Χαρτογράφηση αναγνωσμάτων ή εκ νέου συναρμολόγηση ισομορφών
- D. Συγκριτική έκφραση

Reference gene/genome





ΤΜΗΜΑ

Βιοχημείας &
Βιοτεχνολογίας

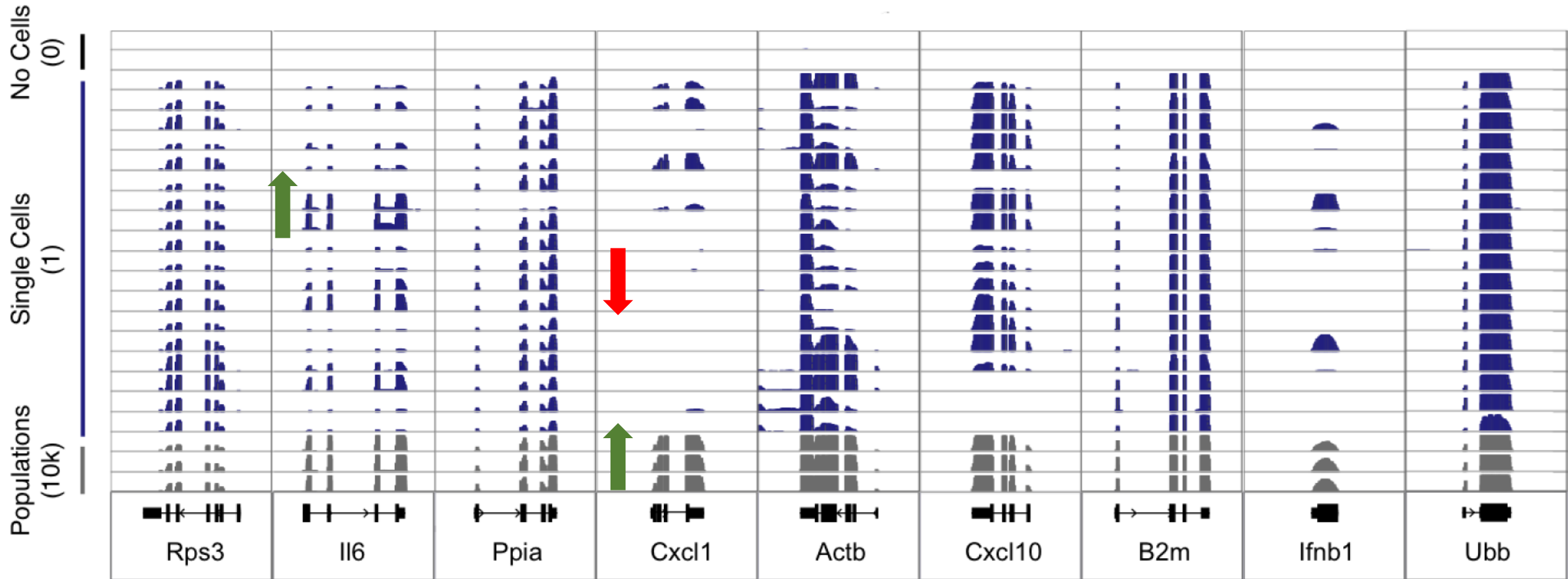
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

2D. Μετα-μεταγραφωματική

Βασικά βήματα:

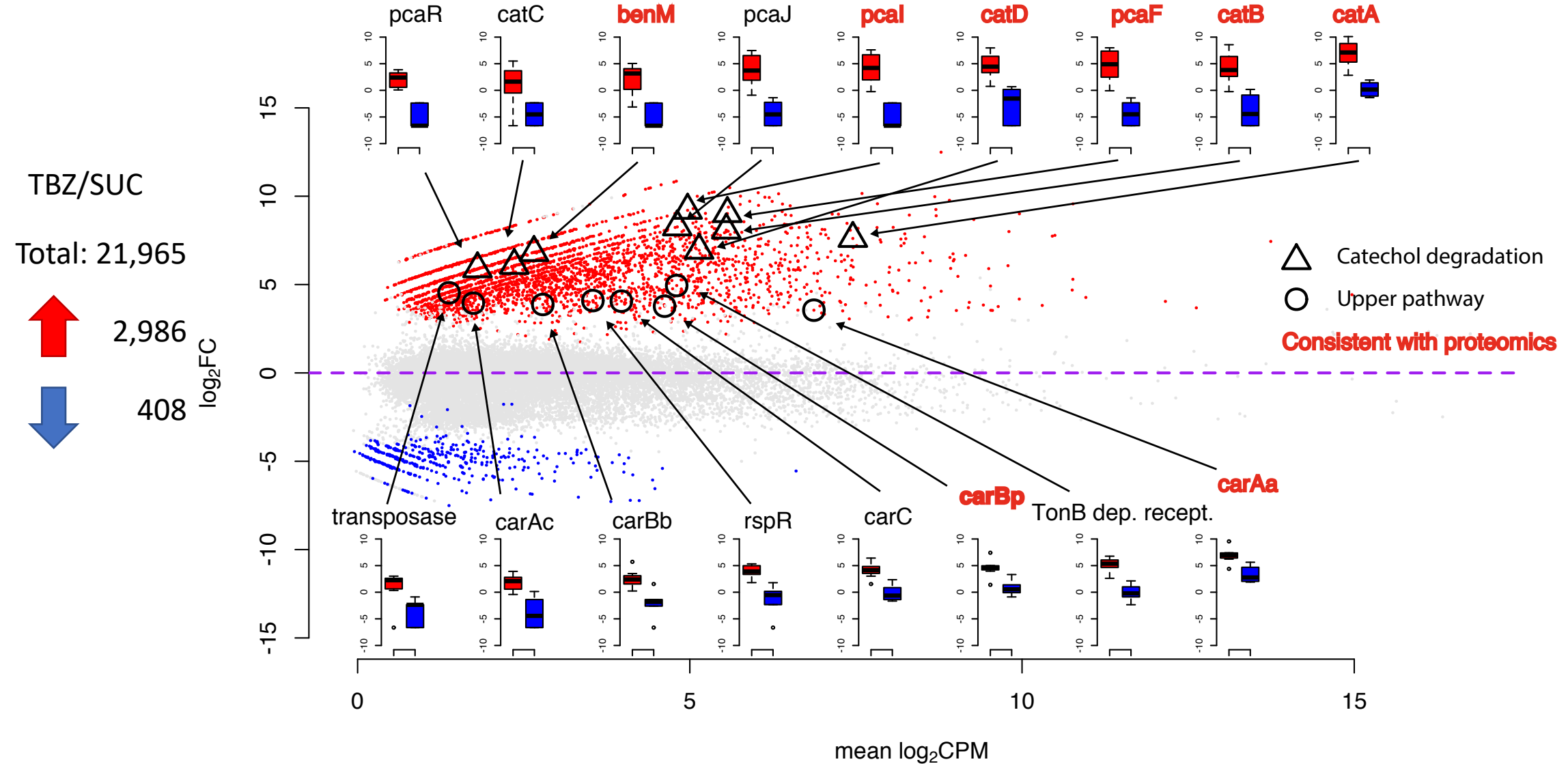
- A. Εκχύλιση ριβονουκλεϊκών οξέων (αναφέρθηκε παραπάνω) και αντίστροφη μεταγραφή σε cDNA
- B. Αλληλούχιση
- C. Χαρτογράφηση αναγνωσμάτων ή εκ νέου συναρμολόγηση ισομορφών
- D. Συγκριτική έκφραση

2D. Μετα-μεταγραφωματική (διαφορική έκφραση ανάμεσα σε πειραματικές συνθήκες)

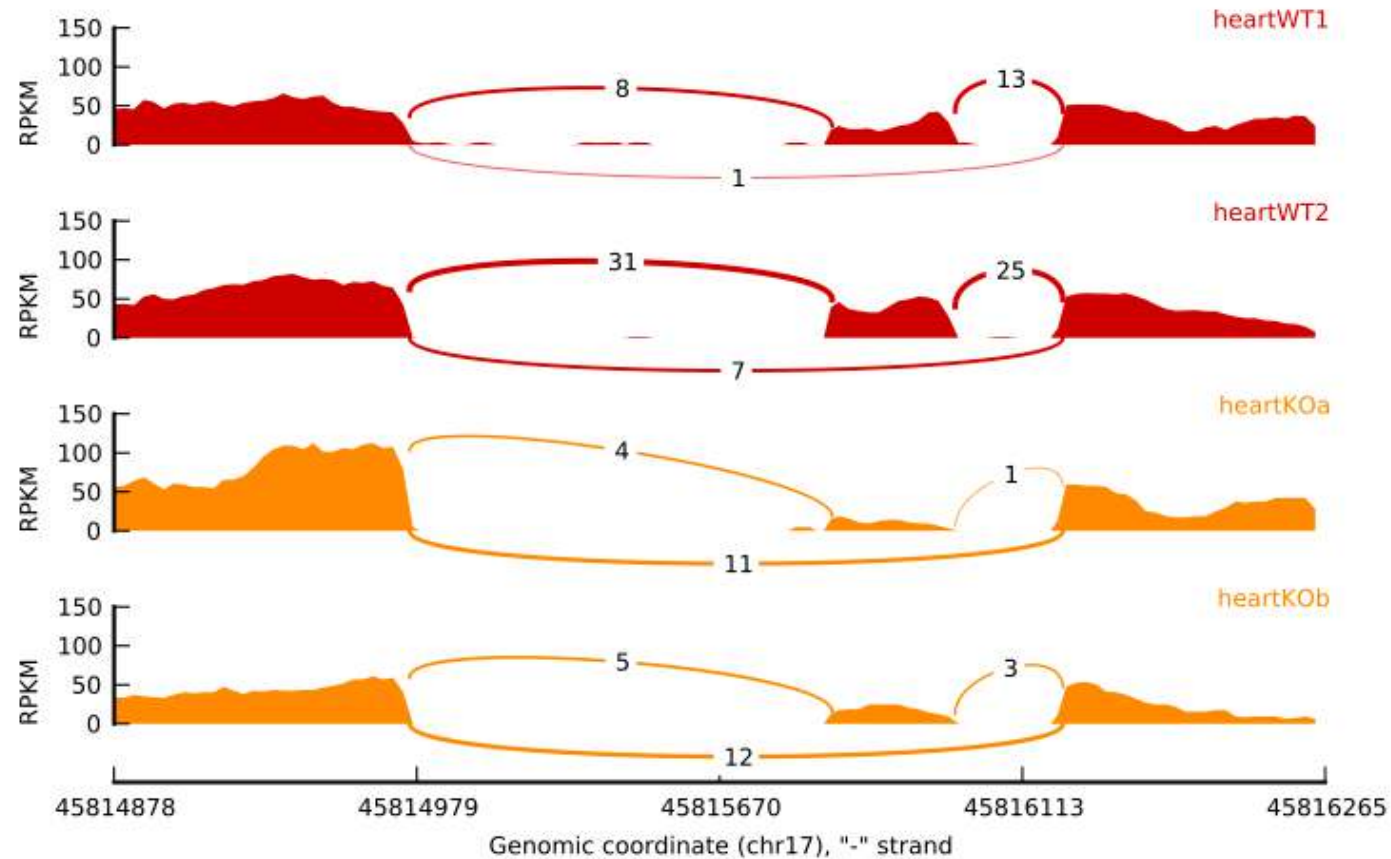


Επίπεδα έκφρασης  Υψηλά  Χαμηλά

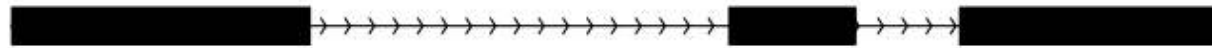
2D. Μετα-μεταγραφωματική (διαφορική έκφραση ανάμεσα σε πειραματικές συνθήκες)



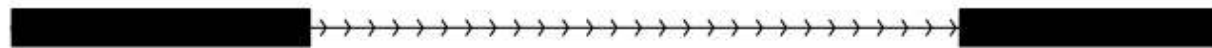
2D. Μετα-μεταγραφωματική (διαφορική έκφραση ως προς ισομορφές για ευκαρυώτες)



Ισομορφή A



Ισομορφή B



3. Μεταπρωτεομική



ΤΜΗΜΑ

Βιοχημείας &
Βιοτεχνολογίας

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

3. Μεταπρωτεομική

Βασικά βήματα:

- A. Εκχύλιση πρωτεϊνών (αναφέρθηκε παραπάνω)
- B. Διαχωρισμός
- C. Ανάλυση
- D. Συγκριτική έκφραση



ΤΜΗΜΑ

Βιοχημείας &
Βιοτεχνολογίας

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

3B. Μεταπρωτεομική

Βασικά βήματα:

A. Εκχύλιση πρωτεϊνών (αναφέρθηκε παραπάνω)

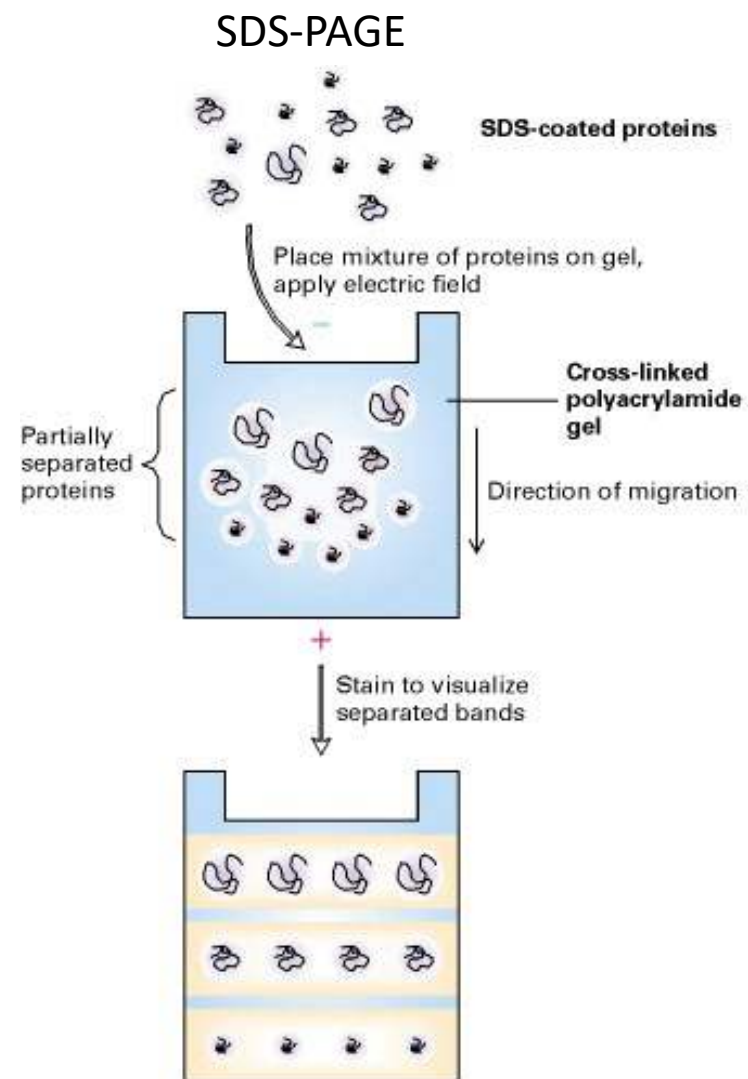
B. Διαχωρισμός

C. Ανάλυση

D. Συγκριτική έκφραση

SDS-PAGE: το ανιονικό sodium dodecyl sulfate (SDS) αποδιατάσσει και φορτίζει αρνητικά τις πρωτεΐνες που αποκτούν το ίδιο ηηλικό φορτίου/μάζας

Οι μετουσιωμένες πρωτεΐνες κινούνται στις ηηκτές πολυακρυλαμίδης ανάλογα με το μέγεθός τους, και συνεπώς, ανάλογα με τη μάζα τους.



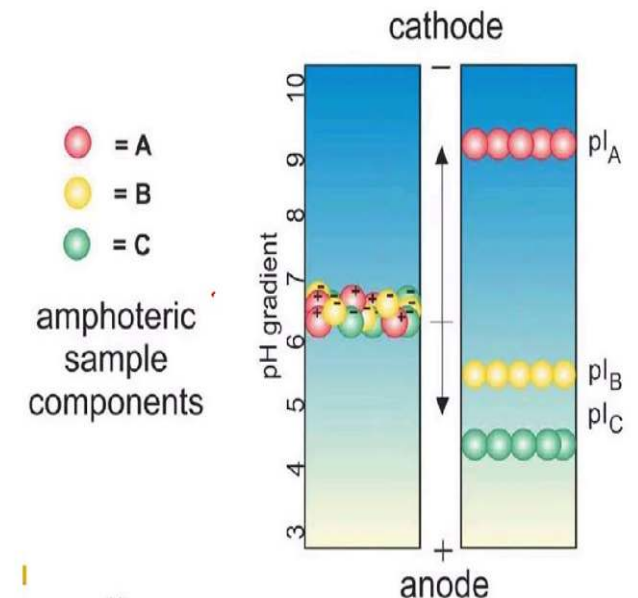
Βασικά βήματα:

- Εκχύλιση πρωτεϊνών (αναφέρθηκε παραπάνω)
- Διαχωρισμός
- Ανάλυση
- Συγκριτική έκφραση

2D-PAGE: Ίδια λογική με το SDS-PAGE αλλά προηγουμένως οι πρωτεΐνες έχουν διαχωριστεί κατά μήκος της 1^{ης} διάστασης ανάλογα με το ισοηλεκτρικό τους σημείο με τη βοήθεια μίγματος ανιο/κατιο-νικών επαμφοτερίζουσων ουσιών.

2D-PAGE

1st dimension
(isoelectric focusing)

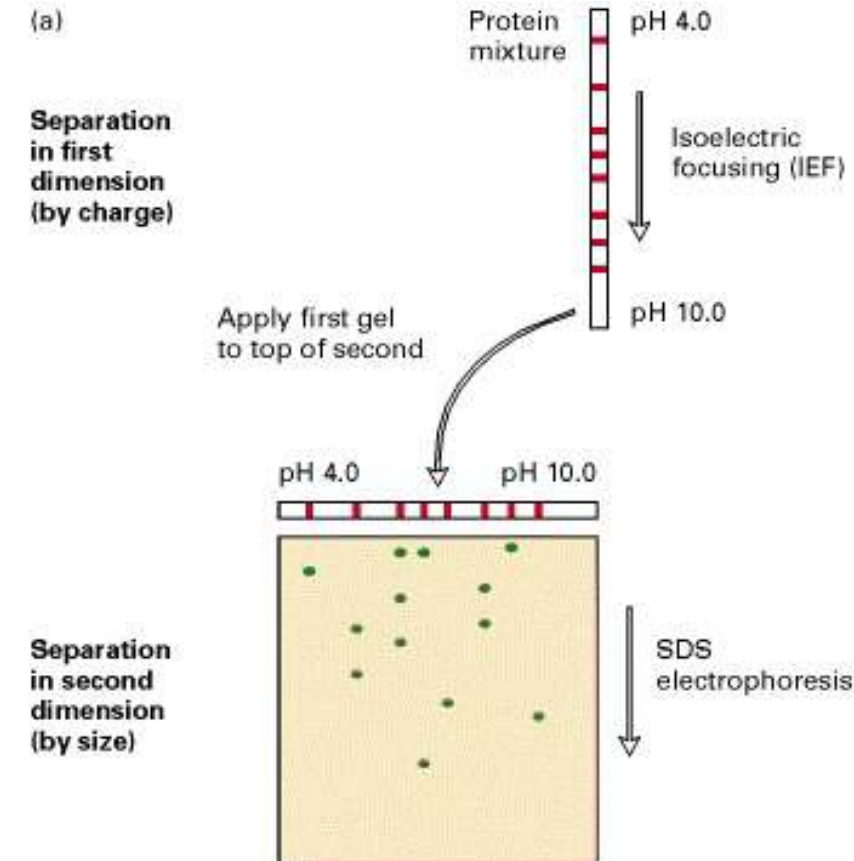


Βασικά βήματα:

- A. Εκχύλιση πρωτεϊνών (αναφέρθηκε παραπάνω)
- B. Διαχωρισμός
- C. Ανάλυση
- D. Συγκριτική έκφραση

2D-PAGE: Ίδια λογική με το SDS-PAGE αλλά προηγουμένως οι πρωτεΐνες έχουν διαχωριστεί κατά μήκος της 1^{ης} διάστασης ανάλογα με το ισοηλεκτρικό τους σημείο με τη βοήθεια μίγματος ανιο/κατιο-νικών επαμφοτερίζουσων ουσιών.

2D-PAGE (complete)





3B. Μεταπρωτεομική

Βασικά βήματα:

A. Εκχύλιση πρωτεϊνών (αναφέρθηκε παραπάνω)

B. Αρχικός διαχωρισμός

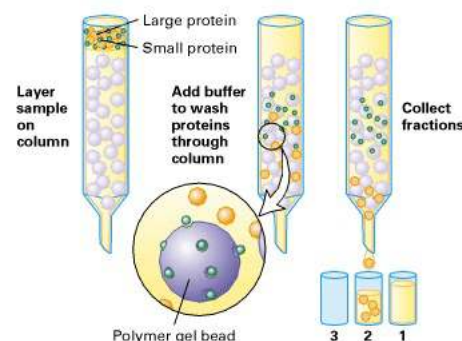
C. Ανάλυση

D. Συγκριτική έκφραση

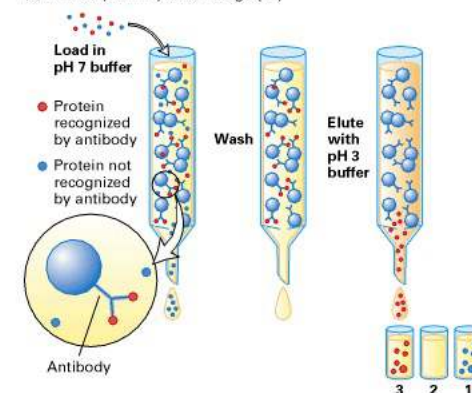
HPLC/LC/Gel
filtration
chromatography

Χρωματογραφίες: Διαχωρισμός ανάλογα με μέγεθος, αλληλουχία, φορτίο

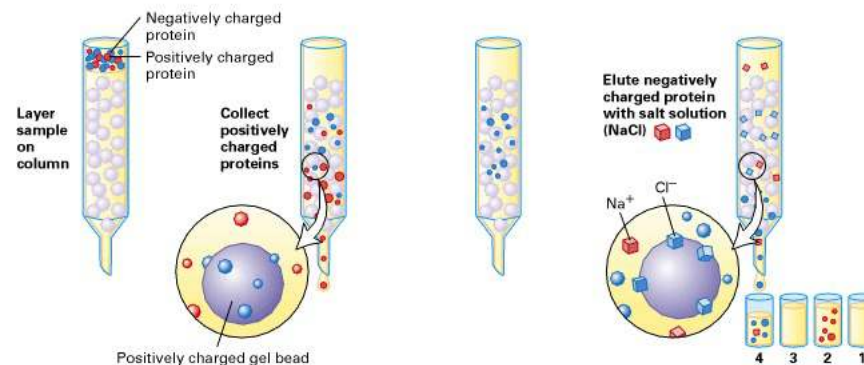
(a) Gel filtration chromatography



(c) Antibody-affinity chromatography



(b) Ion-exchange chromatography





3C. Μεταπρωτεομική

Βασικά βήματα:

- A. Εκχύλιση πρωτεϊνών (αναφέρθηκε παραπάνω)
- B. Διαχωρισμός
- C. Ανάλυση
- D. Συγκριτική έκφραση

Διαχωρισμός



Φασματομετρία (αρχές)

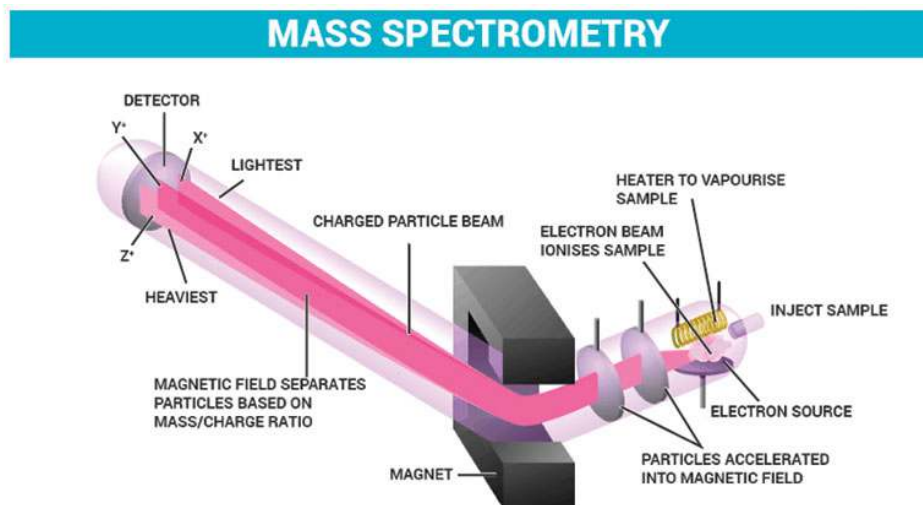
1. Ιοντισμός

- Ηλεκτρονικός ιοντισμός
- Φωτο-ιοντισμός
- Ιοντισμός πεδίου
- Χημικός/θερμικός ιοντισμός
- Βομβαρδισμός ταχέων ατόμων
- **Ηλεκτροψεκασμός**
- **ιοντισμός εκρόφησης με τη βοήθεια χημικού υποστρώματος-μήτρας (matrix assisted laser desorption ionization - MALDI)**

2. Επιτάχυνση

3. Αλλαγή πορείας ανάλογα με τη μάζα

4. Ανίχνευση





3C. Μεταπρωτεομική

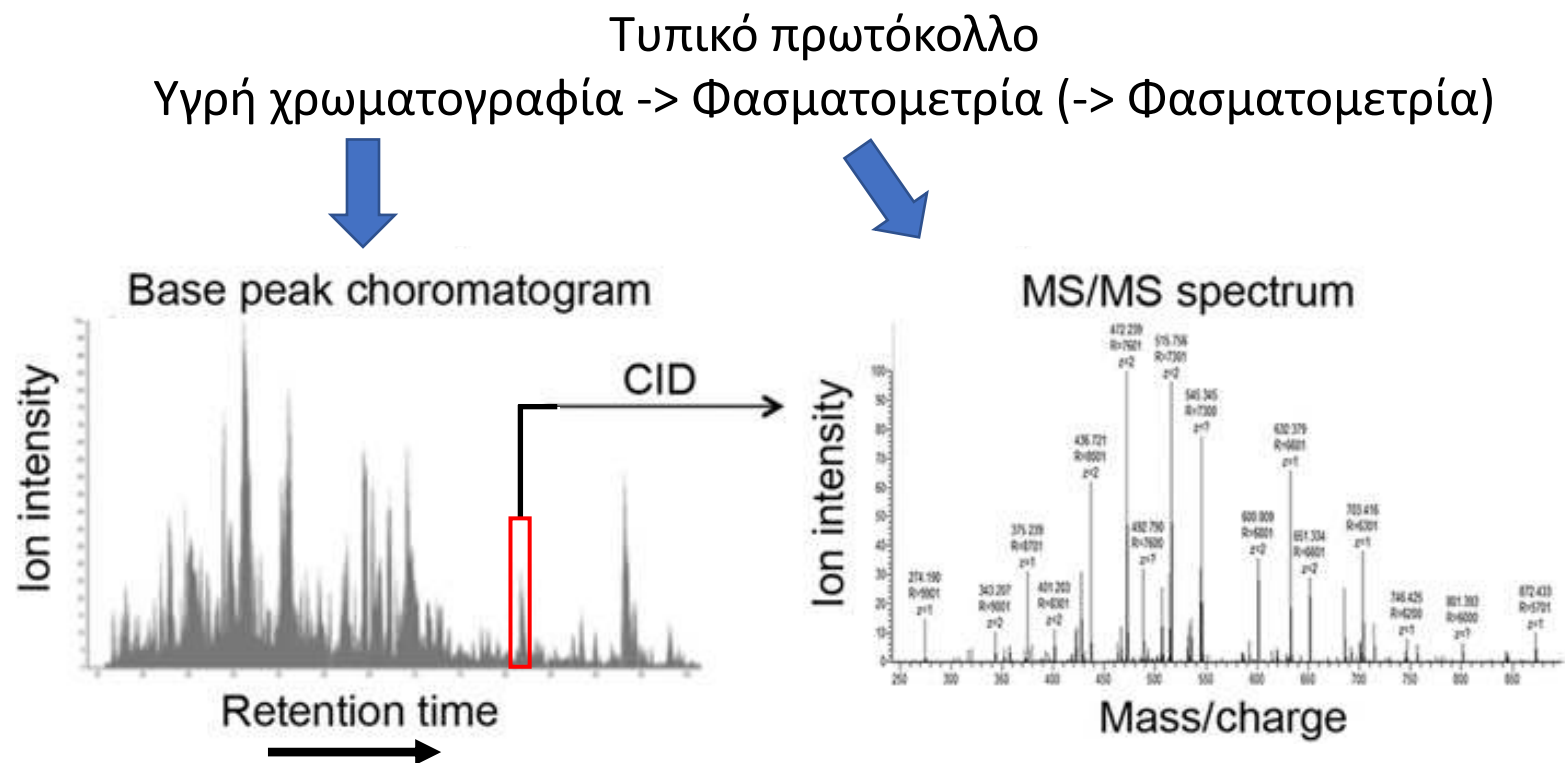
Βασικά βήματα:

A. Εκχύλιση πρωτεϊνών (αναφέρθηκε παραπάνω)

B. Διαχωρισμός

C. Ανάλυση

D. Συγκριτική έκφραση





ΤΜΗΜΑ

Βιοχημείας &
Βιοτεχνολογίας

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

3C. Μεταπρωτεομική

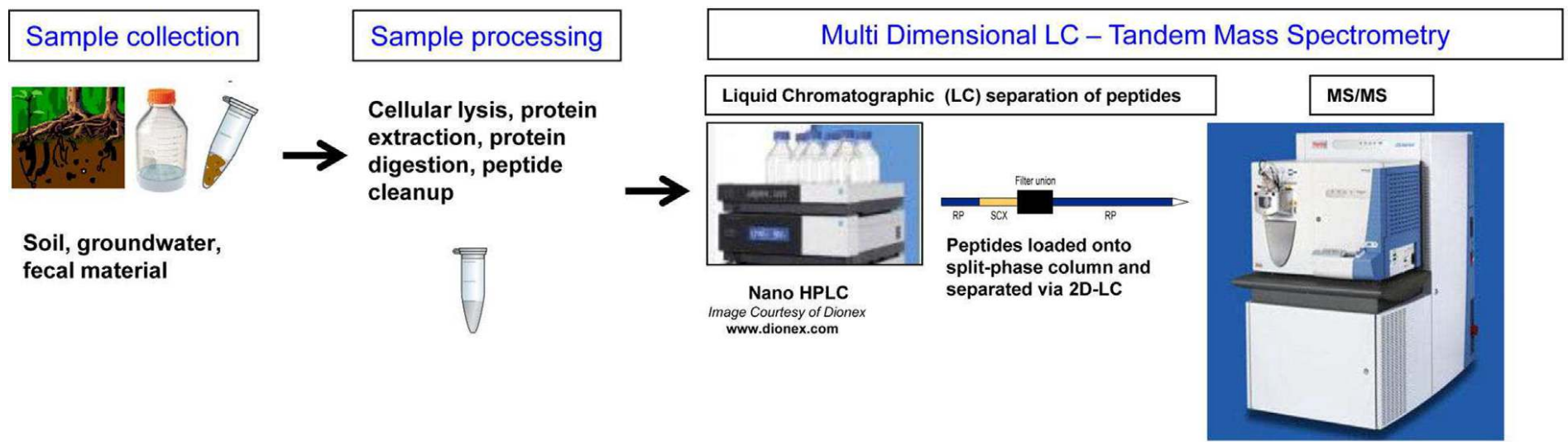
Βασικά βήματα:

- A. Εκχύλιση πρωτεϊνών (αναφέρθηκε παραπάνω)
- B. Διαχωρισμός
- C. Ανάλυση
- D. Συγκριτική έκφραση

Παρόμοια με την περίπτωση RNA



3. Μεταπρωτεομική

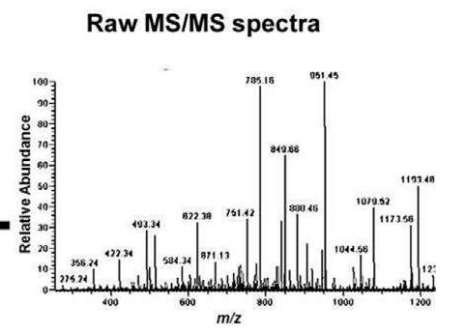


Computational Analysis

Locus ID	Length	Mol Wt (Da)	pI	Spectral counts	Protein Description	Microbe Name
gij270154553	519	57534	6.5	136	vinyl chloride reductive dehal	Dehalococcoides sp. VSJ
gij289433179	519	57611	6.5	135	reductive dehalogenase	Dehalococcoides sp. GTJ
gij288947011	500	54793	6.4	12	reductive dehalogenase	Dehalococcoides sp. GTJ
gij38569261	459	50664	5.7	8	reductive dehalogenase hom	Dehalococcoides sp. CBDB1]
gij146270437	516	57405	6.6	4	reductive dehalogenase	Dehalococcoides sp. BAV1]
gij49339402	516	57405	6.6	4	putative vinyl chloride reduct	Dehalococcoides sp. BAV1]
gij288945845	573	62647	6.8	46	hydrogenase, Fe-only	Dehalococcoides sp. GTJ
gij146269821	573	62676	6.9	45	NAD(P)-dependent iron-only	Dehalococcoides sp. BAV1]
gij147668873	573	62676	6.9	45	hydrogenase, Fe-only	Dehalococcoides sp. BAV1]
gij288945811	526	58041	6.1	29	nickel-dependent hydrogenat	Dehalococcoides sp. GTJ

Proteome characterization of the sample

1. Match Raw MS/MS Spectra with Predicted Spectra from the metagenome
2. Filter peptides and computationally assemble into proteins



4. Μεταβολομική ανάλυση

Όμοια επί της αρχής με πρωτεομική χωρίς τις πολύπλοκες μεθόδους διαχωρισμού (συνήθως υγρή/αέρια χρωματογραφία), και χρησιμοποιεί βάσεις δεδομένων μαζών μορίων.

Bonus: Το άμεσο μέλλον

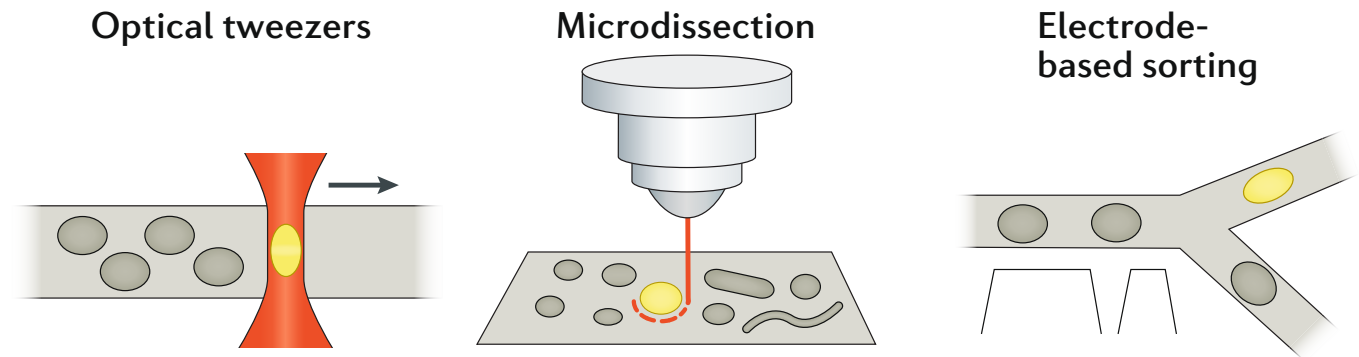
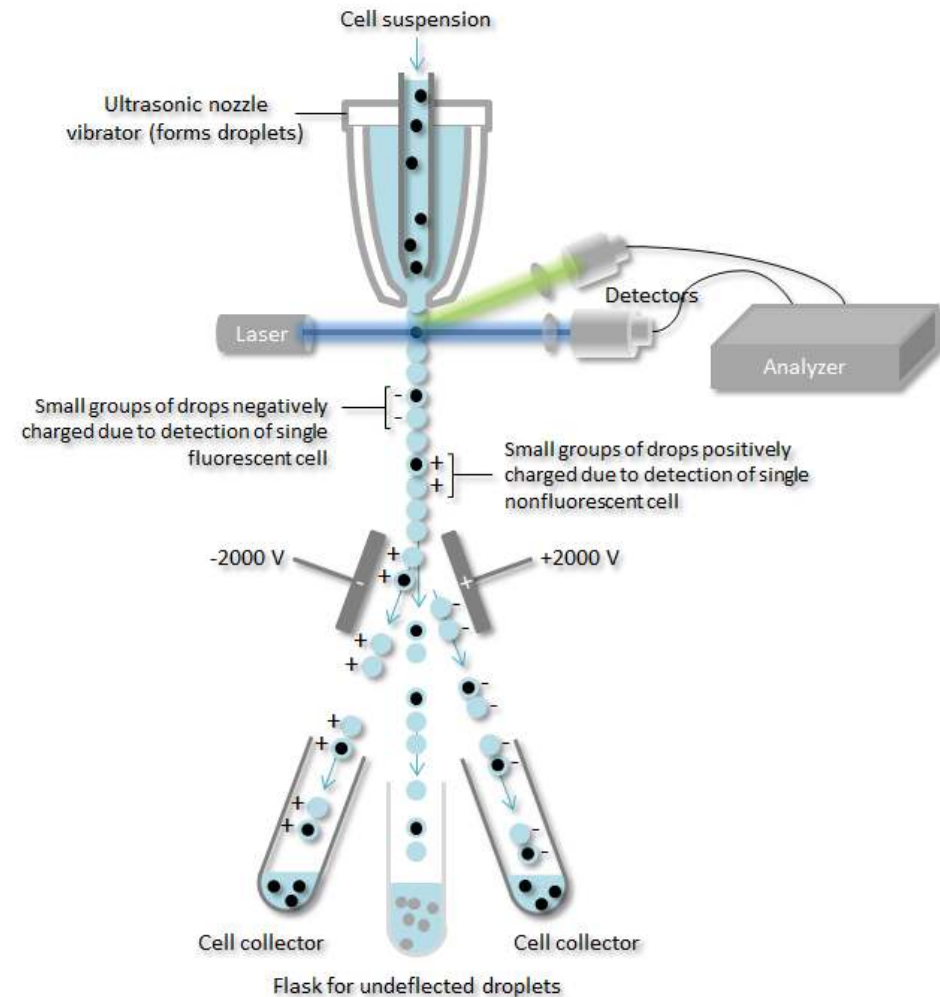
Ως τώρα είδαμε διαχωρισμό των βιομορίων των κυττάρων και μαζική ανάλυσή τους ή ανακατασκευή και μελέτη των γονιδιωμάτων δοτών.

Με τον διαχωρισμό και παράλληλη μελέτη εκατομμυρίων κυττάρων μπορούμε να πετύχουμε ανάλυση δίχως προηγούμενο σε επίπεδο βιολογίας συστημάτων

Bonus: Ανάλυση σε επίπεδο κυττάρου

Διαχωρισμός κυττάρων π.χ. με:

- Κυτταρομετρικές ροές
- Οπτικές λαβίδες
- Μικροτόμους
- Συσκευές μικροϋδραυλικής



Case study time



UNIVERSITY OF
THESSALY



DEPARTMENT OF
**Biochemistry &
Biotechnology**
UNIVERSITY OF THESSALY



H2020 MSCA-IF-2017
EMIGRATE (grant #749463)

Roles and interactions of the members of a bacterial consortium along the degradation of the recalcitrant fungicide thiabendazole revealed via multi-omic approach

Sotirios Vasileiadis

University of Thessaly (**Greece**): Chiara Perruchon, **Dimitrios G. Karpouzas***

Helmholtz Centre for Environmental Research GmbH (**Germany**): Benjamin Scheer, Lorenz Adrian, Nicole Steinbach, Antonis Chatzinotas

Univ. of Almeria: Ana Agüera

Agricultural Research Institute of Cyprus: Michalis Omirou

project site: <http://emigrate.bio.uth.gr>



Background - Aims

Thiabendazole affects cells:

- fungicide mainly used in post-harvest treatment (inhibits microtubulin polymerization)
- Anthelmintic (inhibits fumarate reductase)
- possible effect on bacterial growth has been hypothesized (purine synthesis due to competition; inhibition of FtsZ for septum formation during binary fission -> filamentous growth)

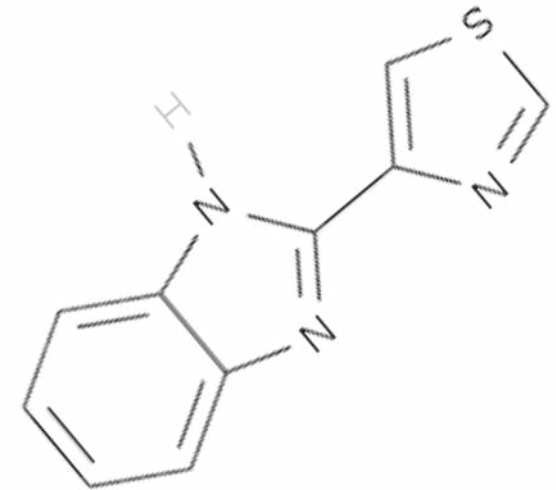
Accumulates in the environment

- recalcitrant under temperate conditions ($DT_{50} \approx 403$ days in soil)
- previously, no known biodegraders
- In the absence of economically viable methods, land spreading is a common practice

Recent UTh work:

- enrichment of a consortium able to degrade it
- Diversity analysis and a first round of SIP
- antibiotics treatment for isolation -> phenotype loss

Aims: characterize the consortium and identify the upper pathway enzymes using an omics approach



Experimental setup

Minimal salts medium with nitrogen (MSMN)
inoculated with a TBZ grown consortium (5%)
with sole carbon source:

Thiabendazole
(TBZ)
25 $\mu\text{g ml}^{-1}$

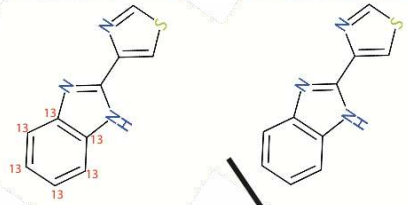


Bioassays

^{13}C -Thiabendazole
(^{13}C -TBZ / SIP)
25 $\mu\text{g ml}^{-1}$

Thiabendazole
(TBZ)
25 $\mu\text{g ml}^{-1}$

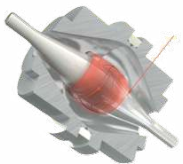
Succinate
(SUC)
37 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (equivalent C to TBZ conc.)



TBZ content (HPLC)



Orbitrap LC-MS



Time resolved

TBZ screening (HPLC)

16S rRNA gene diversity (HiSeq)

Shotgun sequencing: DNA (4 conditions) and rRNA depleted RNA (3 timepoints X 2 treat. X 3 reps)

Time resolved

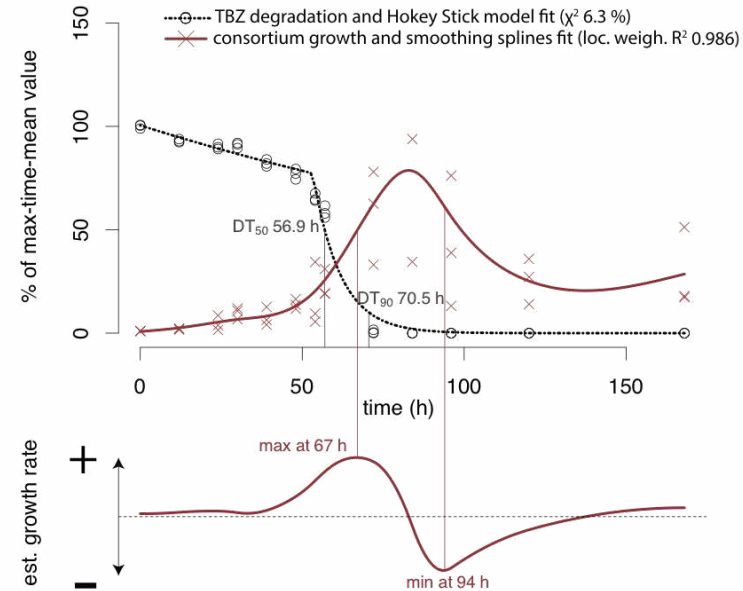
TBZ degradation (HPLC)

16S rRNA gene quantity (qPCR)

16S rRNA gene diversity (HiSeq)

Metabolites (LC/ESI-MS)

Proteins (orbitrap LC-MS on corresponding RNAseq samples)



16S rRNA gene copies (qPCR)



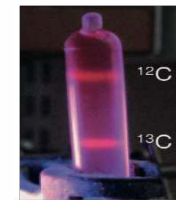
Metabolites (LC/ESI-MS)



**stable isotope probing (SIP)
mass based DNA fractionation**



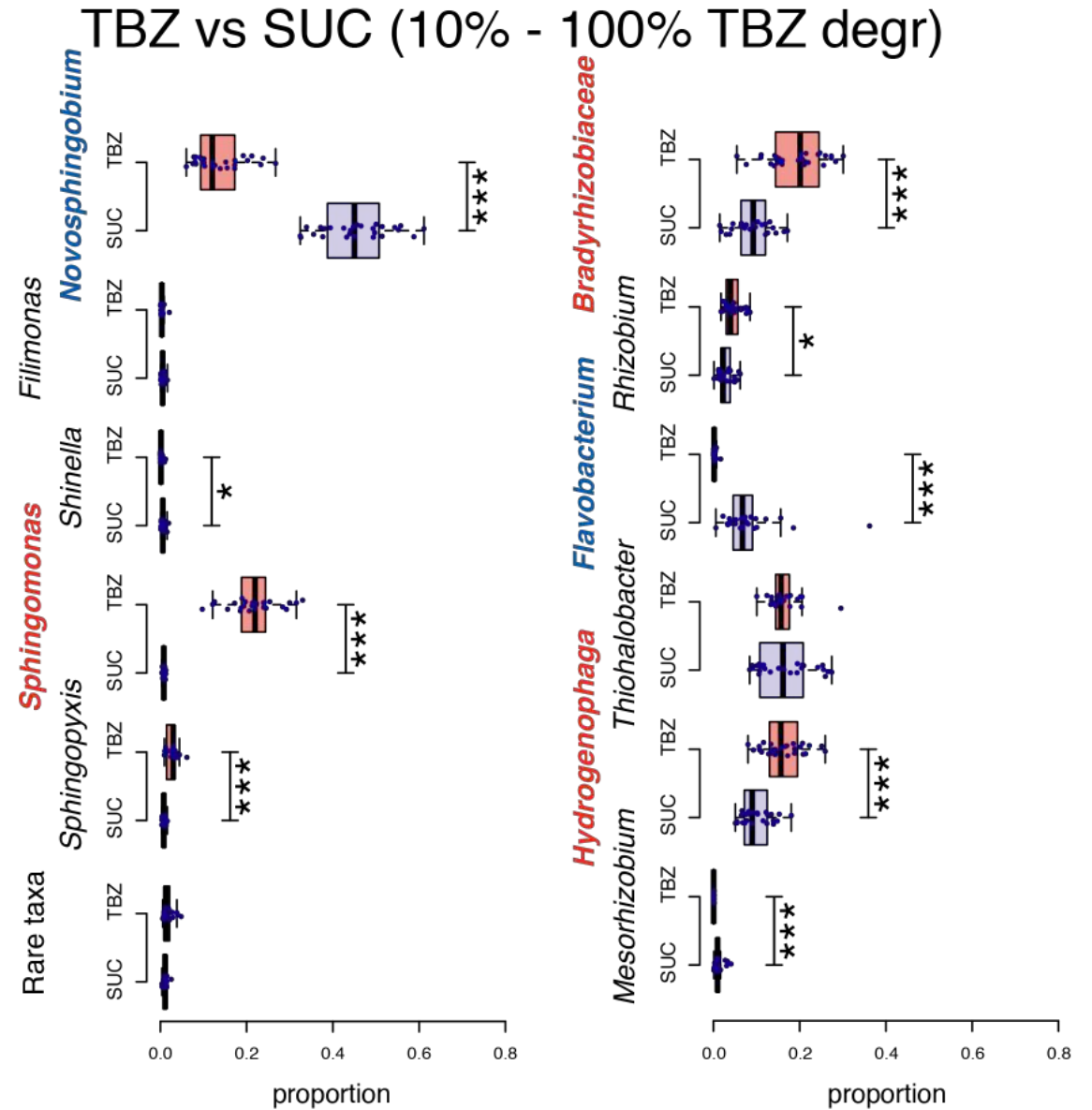
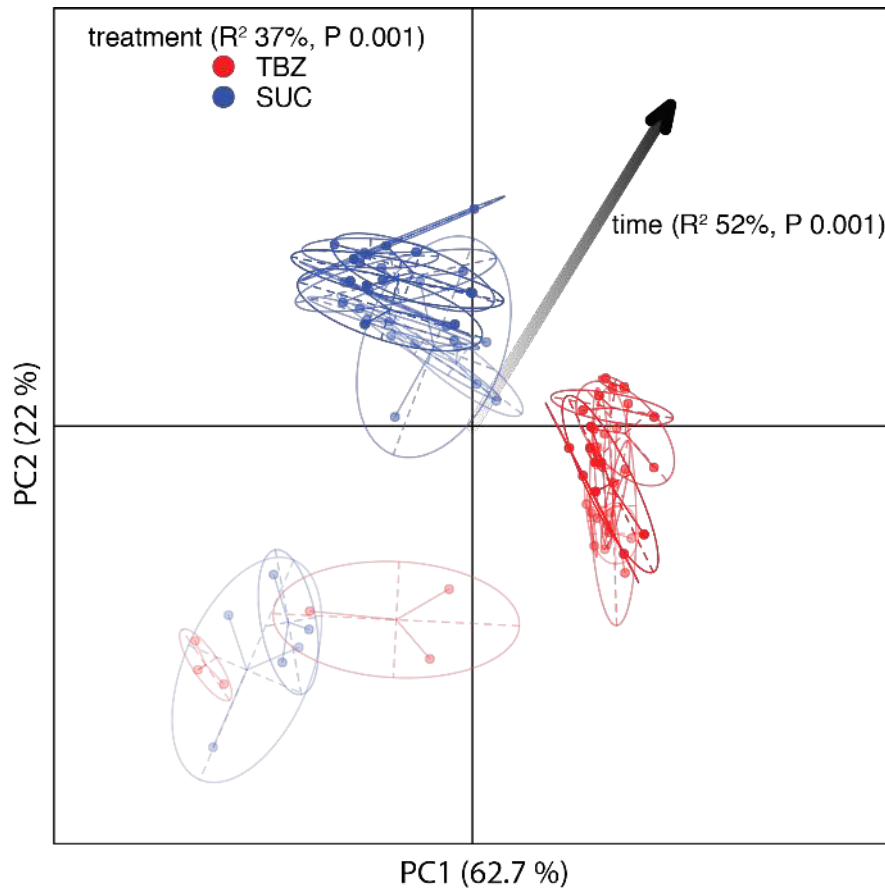
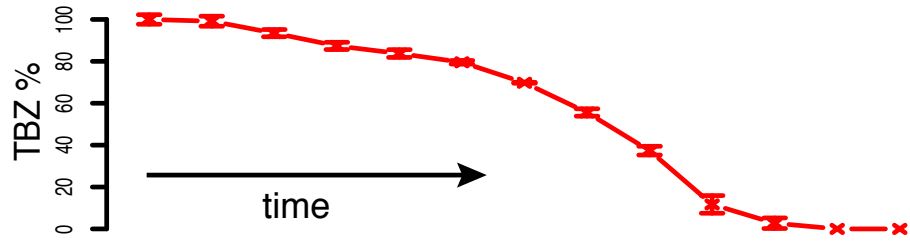
Neufeld et al, 2007
doi:10.1038/nprot.2007.109



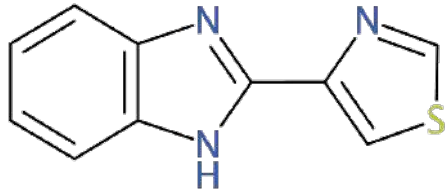
**Illumina HiSeq (2X250) sequencing
16S rRNA gene V4
shotgun DNA/RNA**



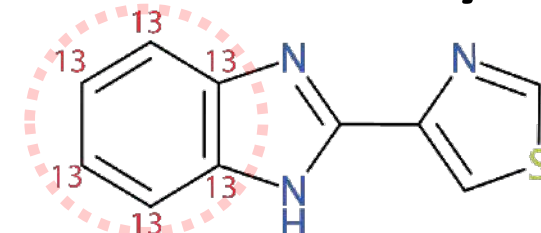
SSU diversity



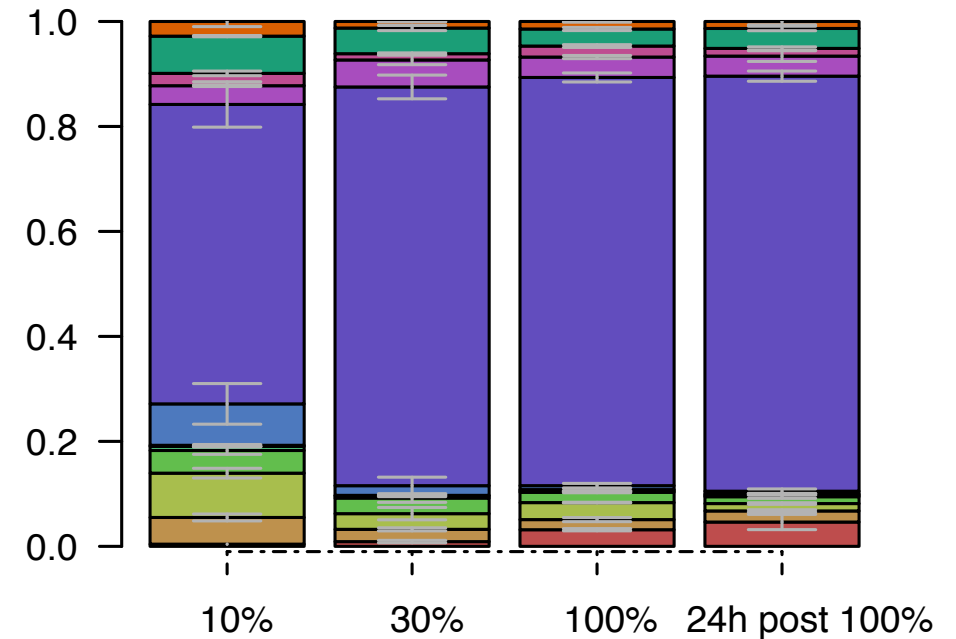
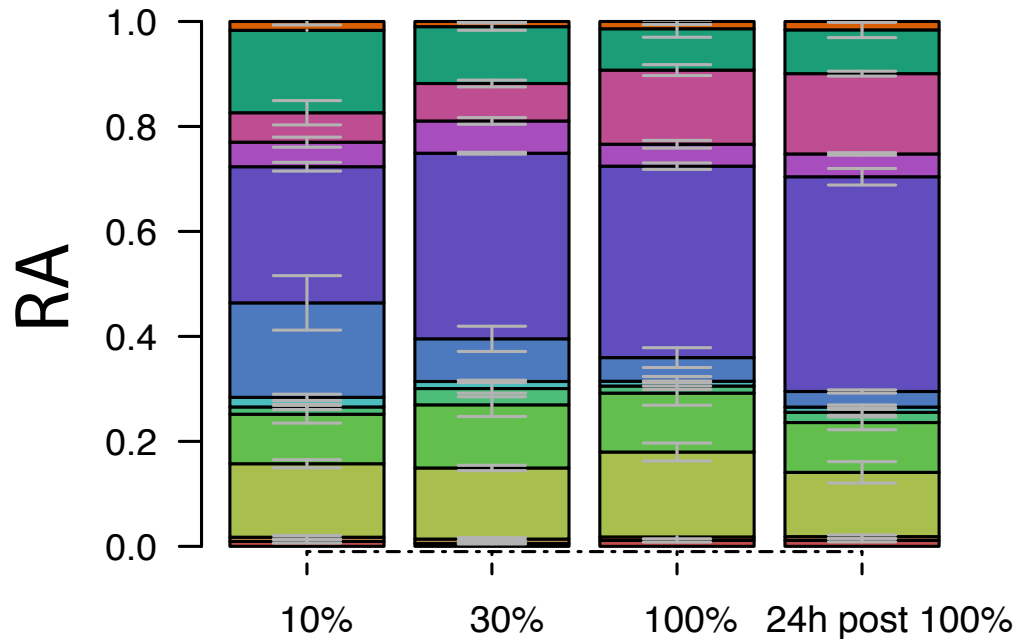
SIP (¹³C) SSU diversity



¹²C-DNA fraction (unlabeled TBZ)



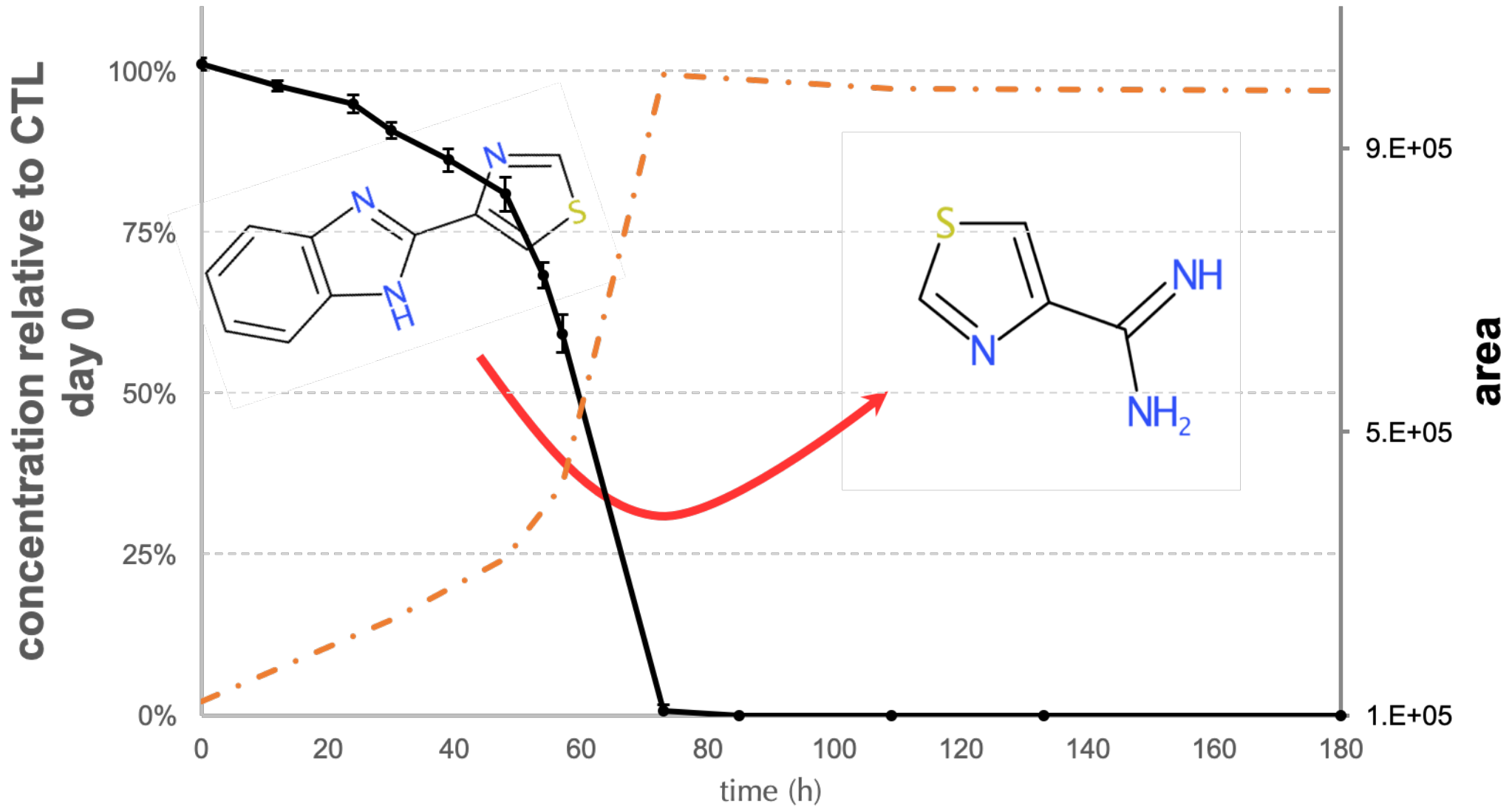
¹³C-DNA fraction (labeled TBZ)



TBZ degradation (% of initial)



TBZ main metabolite



Metagenome assembled genomes (MAGs)

Metawatt (Strous et al 2012; 10.3389/fmicb.2012.00410) bin IDs and stats				MiGA (Rodriguez-R et al, 2018; 10.1093/nar/gky467) NCBI hits				MiGA binning quality			
Bin ID	cntg#	size(nt)	N50(nt)	GC(%)	Class	Strain	AAI or ANI (%)	MiGA classification confident at level	completeness (%)	contamination (%)	quality (%)
Bin 3X21F	38	3,388,361	206,417	62.4	α -Proteobacteria	<i>Sphingomonas</i> sp. DC 6	61.91 (AAI)	Genus	95.5	0.9	91
Bin 34A	52	4,618,291	136,635	65.2	γ -Proteobacteria	<i>Thiohalobacter thiocyanaticus</i>	45.72 (AAI)	Class	94.6	0.9	90.1
Bin 19A	189	5,487,813	61,470	65.8	β -Proteobacteria	<i>Hydrogenophaga</i> sp. RAC07	78.96 (AAI)	Subspecies	90.1	1.8	81.1
Bin 9B	25	4,220,254	315,044	62.1	α -Proteobacteria	<i>Bradyrhizobiaceae</i> bacterium SG 6C	92.33 (ANI)	Subspecies	94.6	0.9	90.1
Bin 13A	118	5,825,532	101,074	67.8	β -Proteobacteria	<i>Hydrogenophaga</i> sp. RAC07	81.07 (AAI)	Subspecies	91.9	6.3	60.4
Bin 23F	283	5,140,160	107,438	69.6	β -Proteobacteria	<i>Hydrogenophaga</i> sp. PBC	89.76 (AAI)	Subspecies	89.2	2.7	75.7

13 low abundance bins	3,862	61,120,920	101,474
<100Kb bins	571	1,464,056	4,814
unbinned	1,650	7,278,568	24,154

Total	6,788	98,543,955	100,895
--------------	--------------	-------------------	----------------

	Bin relative abundance			
	13C TBZ 10% degradation	50% TBZ degradation	100% TBZ degradation	24 h post TBZ disappearance
<i>Sphingomonas</i> sp. DC 6	64.76	23.96	19.62	10.05
<i>Thiohalobacter thiocyanaticus</i>	1.11	13.48	22.78	29.17
<i>Hydrogenophaga</i> sp. RAC07	0	11.71	1.83	0
<i>Bradyrhizobiaceae</i> bacterium SG 6C	2.58	5.93	17.83	25.23
<i>Hydrogenophaga</i> sp. RAC07	0.05	5.18	2.24	2.06
<i>Hydrogenophaga</i> sp. PBC	1.29	4.21	10.02	12.35

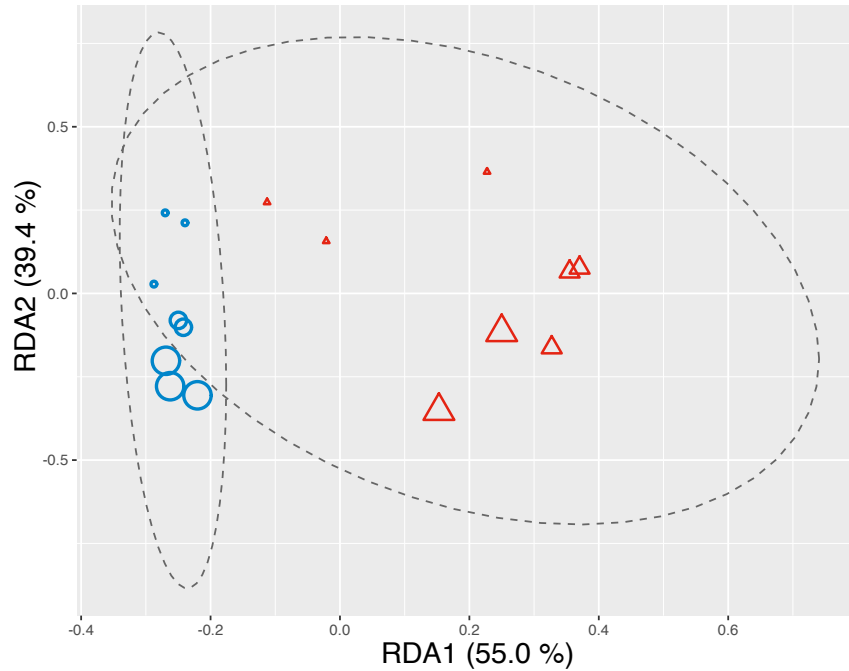
1% < x < 5%	
5% < x < 10%	
10% < x	

Gene expression: profiles

(40% degradation, 100% degradation, 24h post degradation)

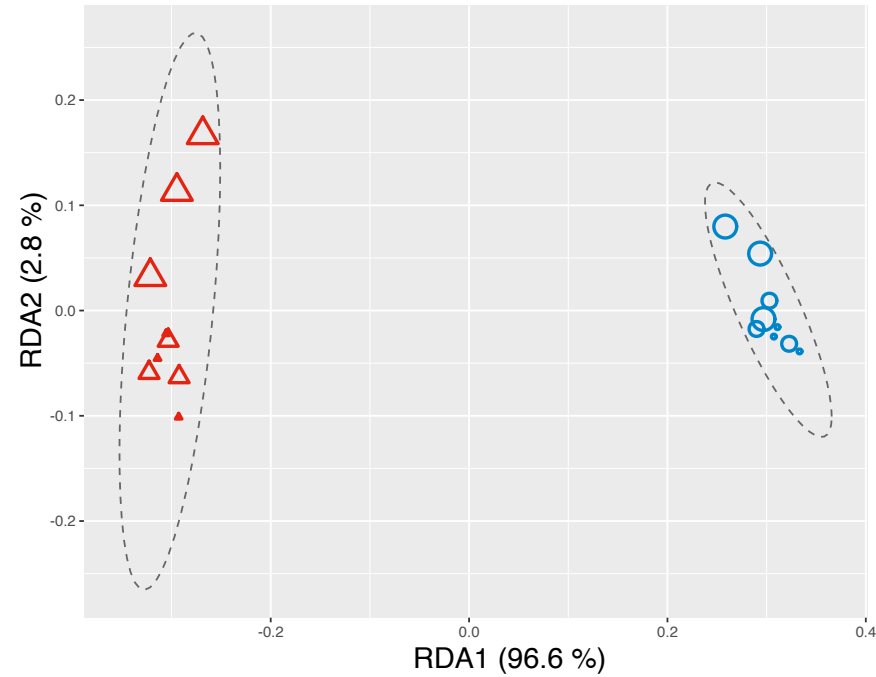
RNA

model: comm. struct. ~ treat + time (72.9% of total var., P 0.001)
 part. of explained variance: treat/time = 48.4%, P 0.001 / 51.6%, P 0.001



proteins

model: comm. struct. ~ treat + time (86.1% of total var., P 0.001)
 part. of explained variance: treat/time = 96.5%, P 0.001 / 3.5%, P 0.288



TBZ/SUC

Total: 21,965

↑ 2,986

↓ 408

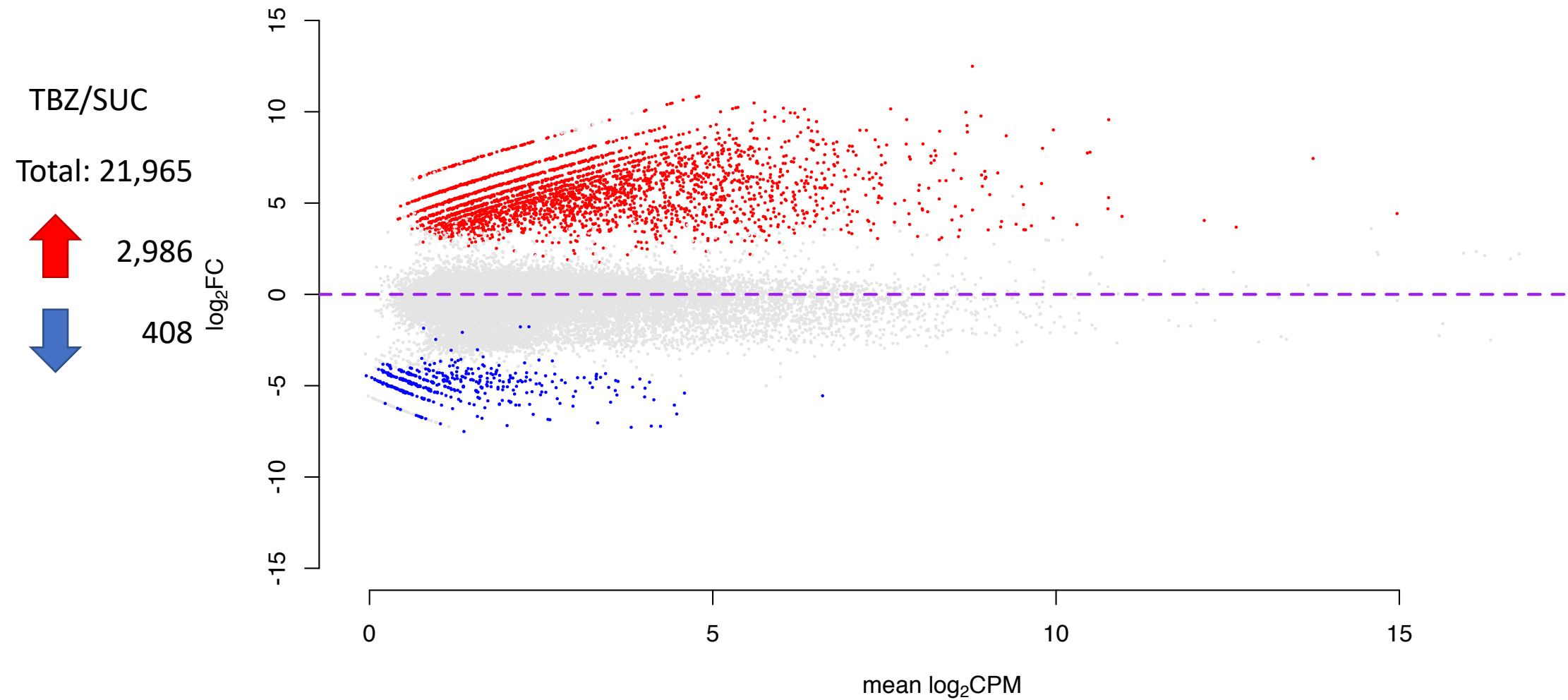
TBZ/SUC

Total: 2,602

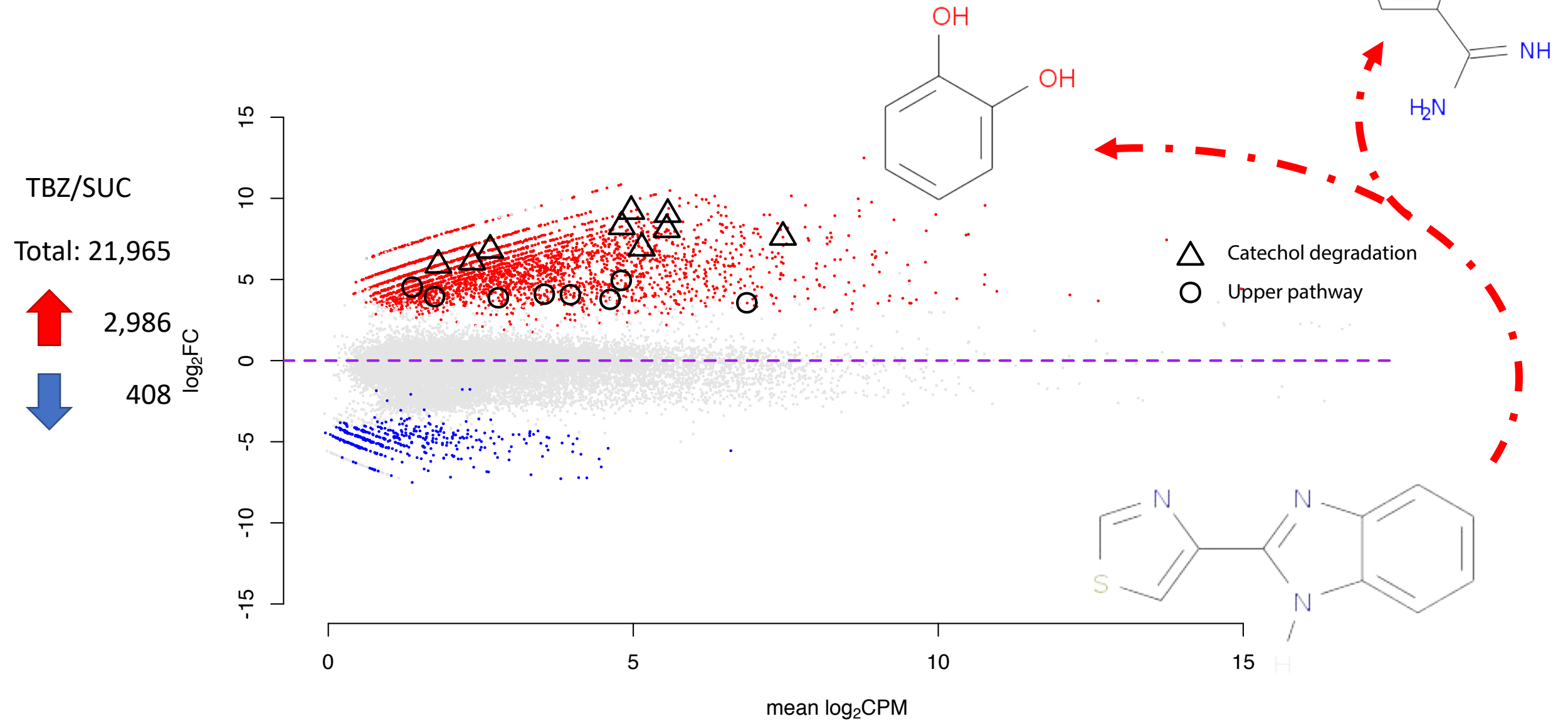
↑ 423

↓ 652

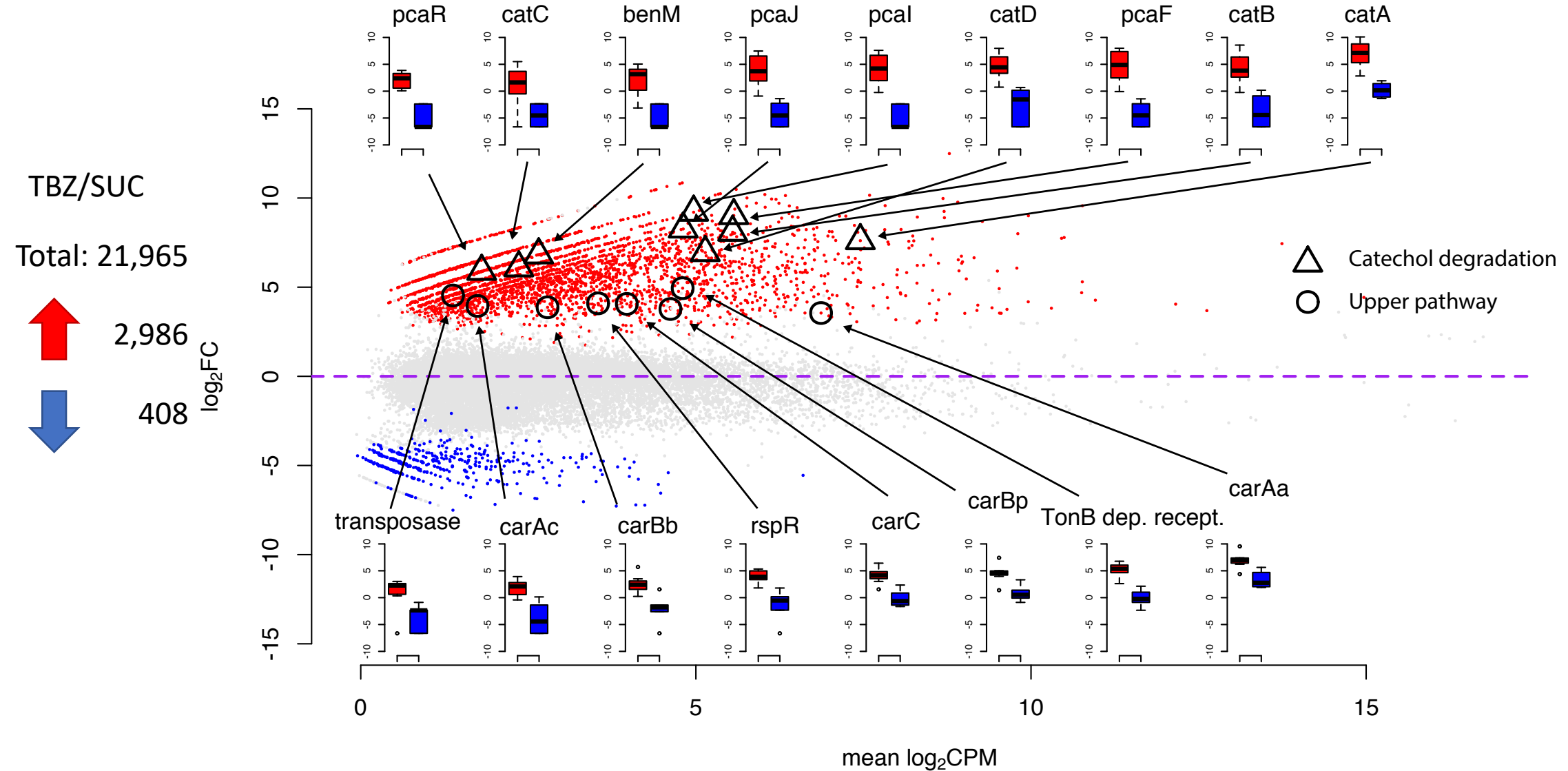
Gene expression: degradation genes



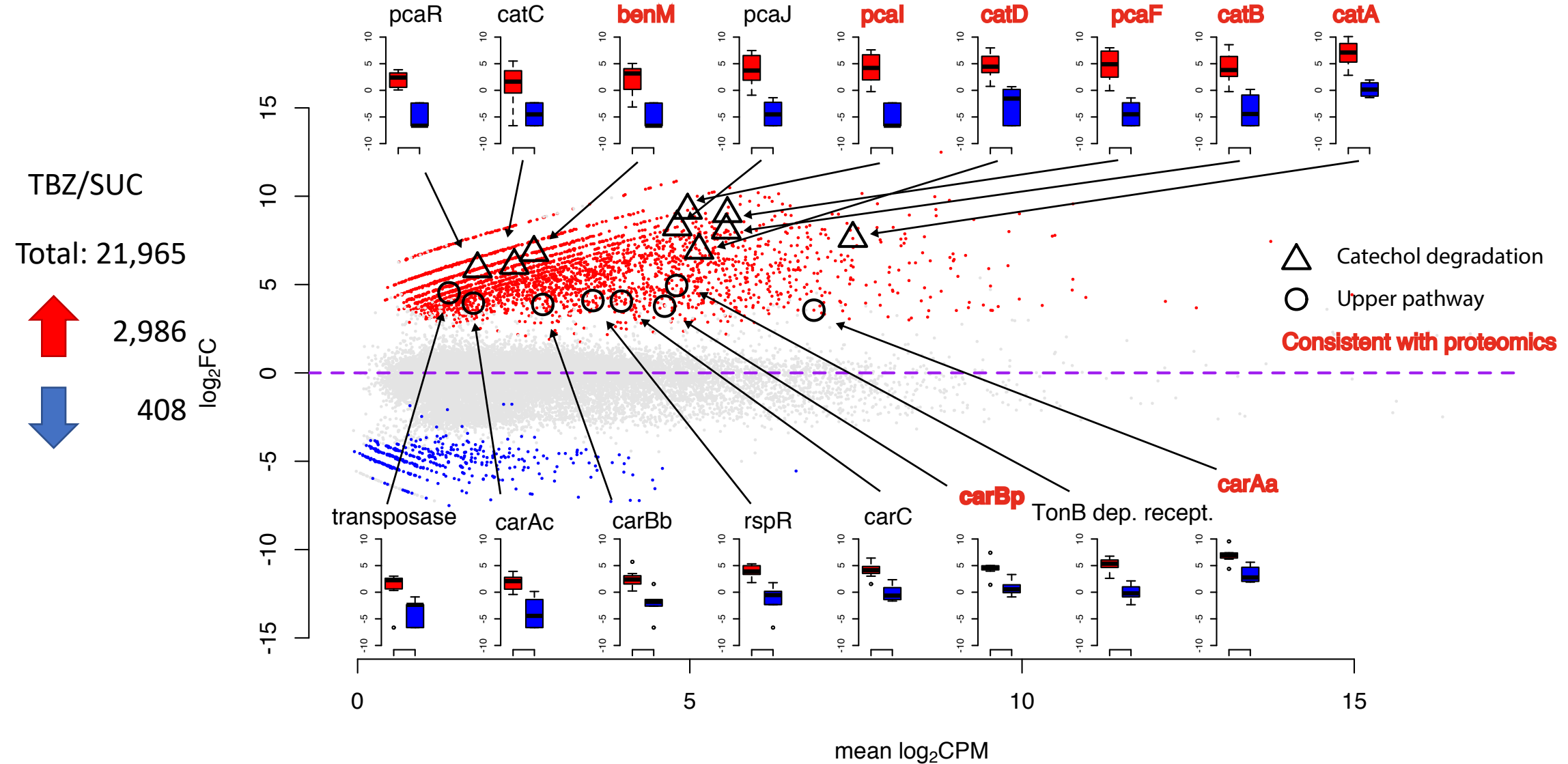
Gene expression: degradation genes



Gene expression: degradation genes

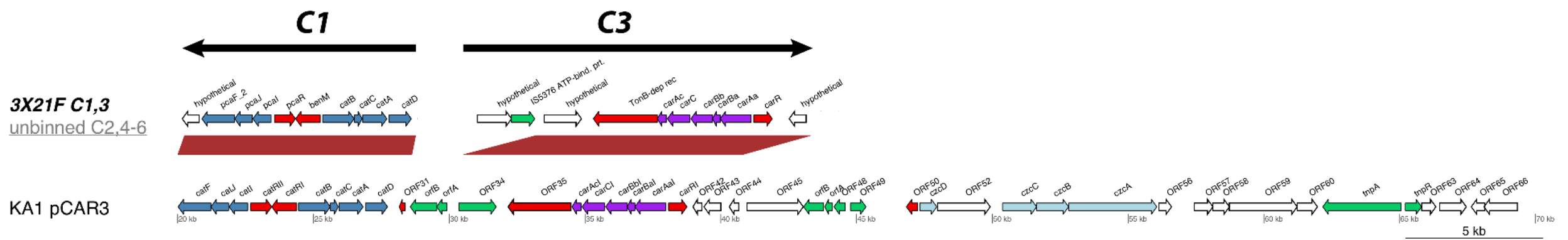


Gene expression: degradation genes



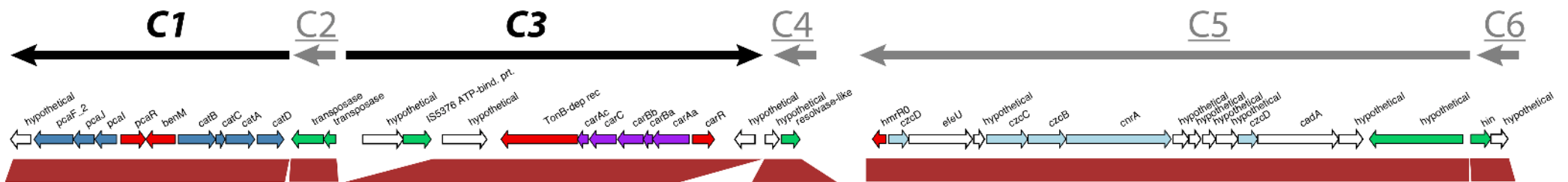
Comparative: structure (Upper pathway genes)

- Carbazole dioxyg.
- Catechol
- Co/Zn/Cd efflux
- Regulatory
- Mobile
- Other/unknown

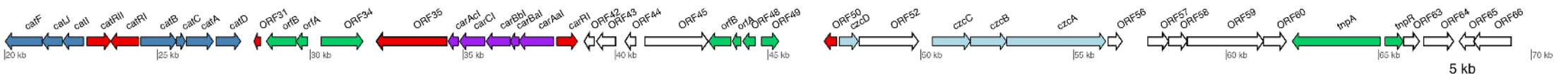


Comparative: structure (Upper pathway genes)

3X21F C1,3
 unbinned C2,4-6

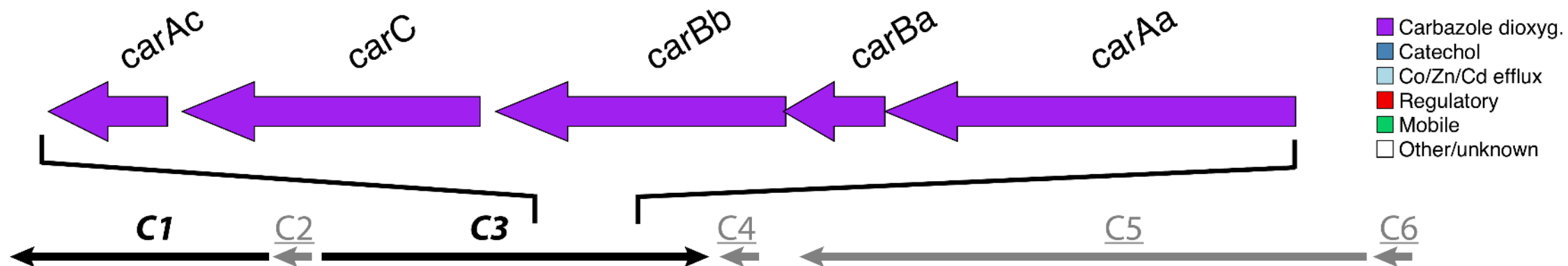
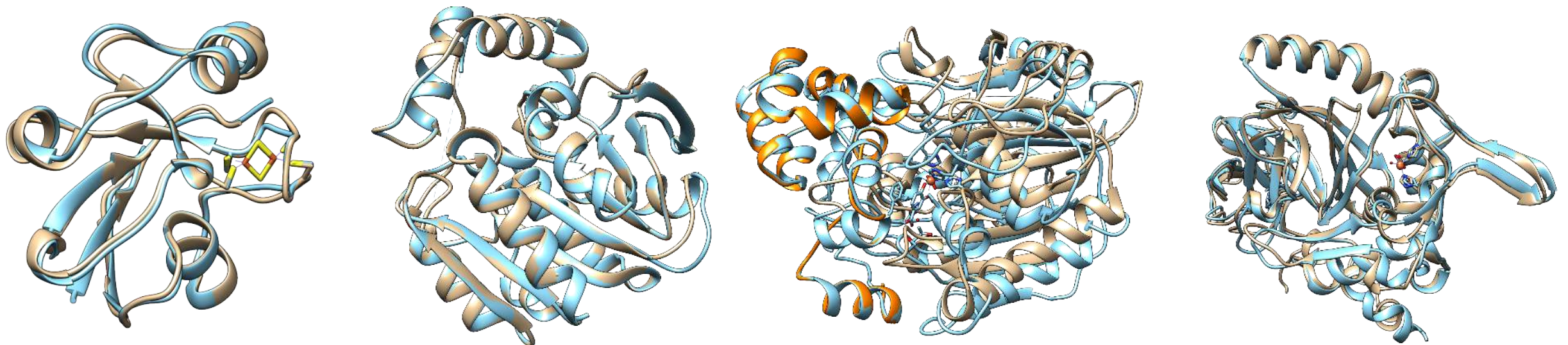


KA1 pCAR3

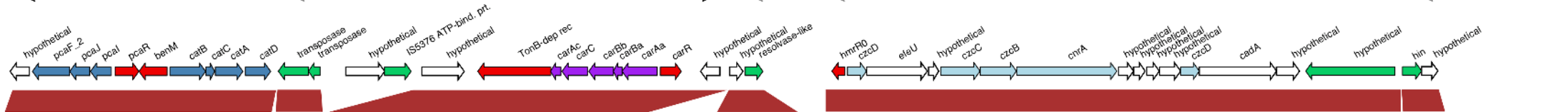


- Carbazole dioxyg.
- Catechol
- Co/Zn/Cd efflux
- Regulatory
- Mobile
- Other/unknown

Comparative: structure (Upper pathway genes)



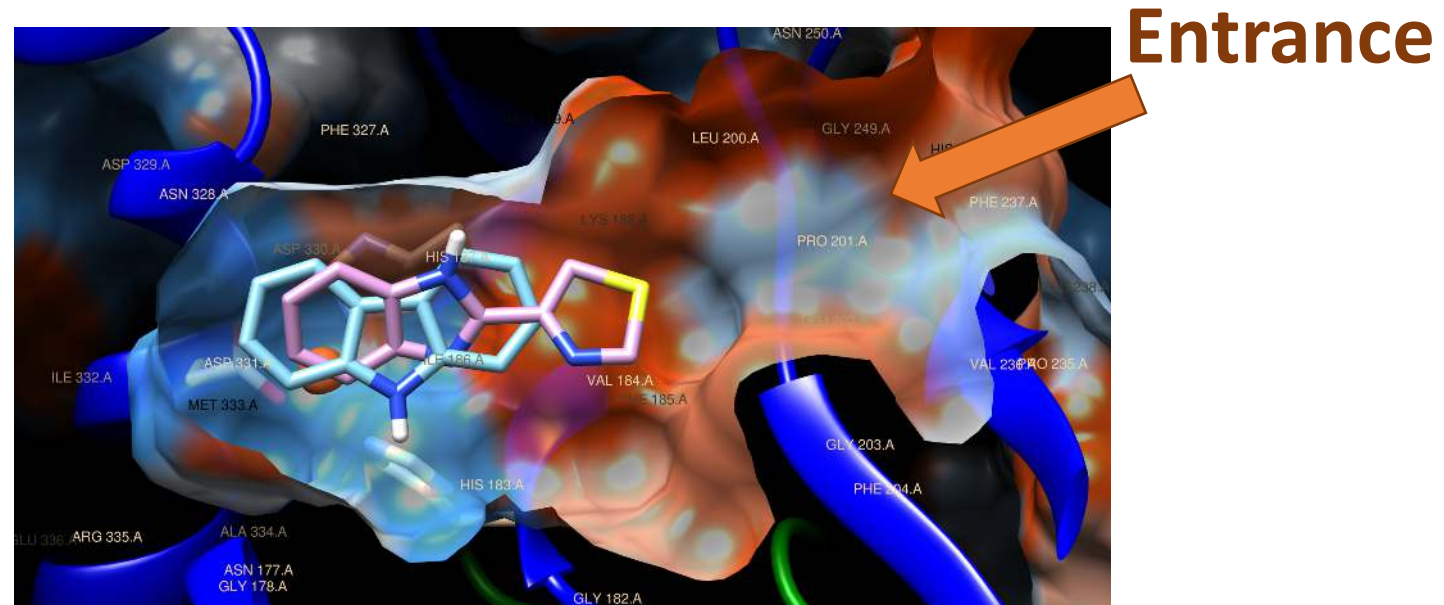
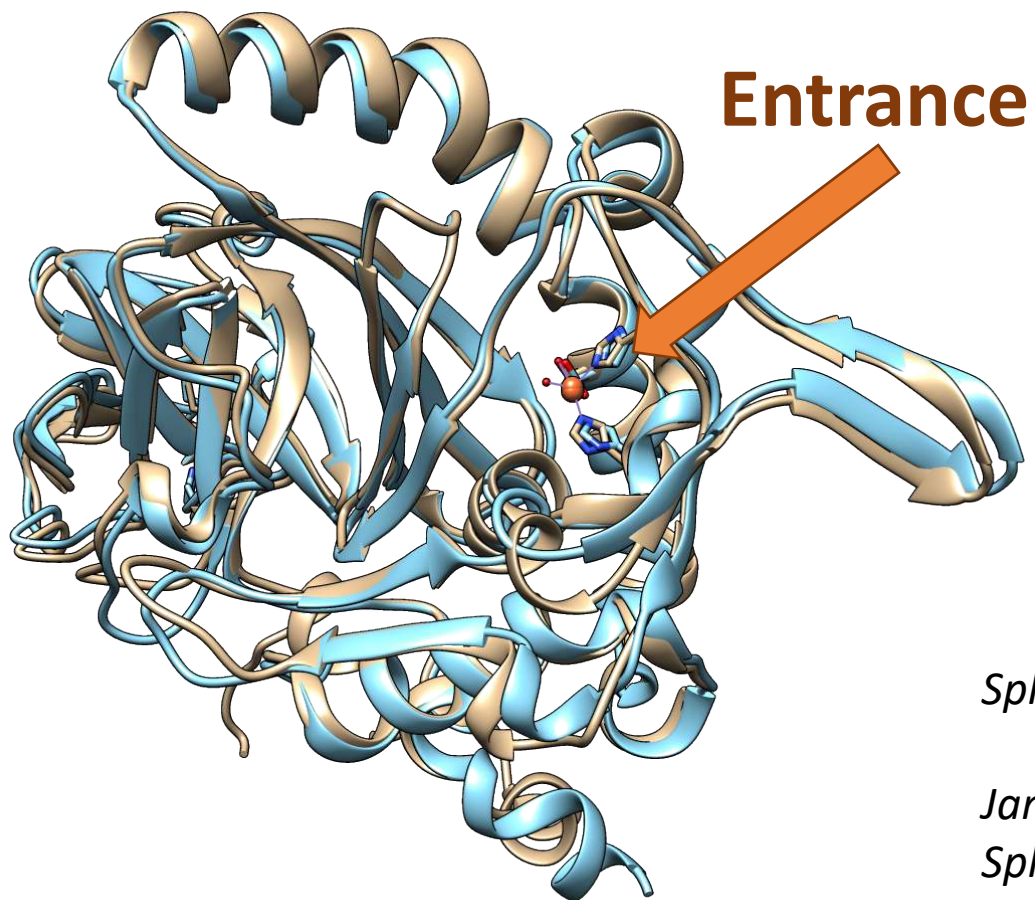
3X21F C1,3
 unbinned C2,4-6



KA1 pCAR3



Structural: docking (CARDO)



Sphingomonas 3X21F (ΔG) of carbazole/thiabendazole: $-7.5/-6.8$ kcal mol $^{-1}$

Janthinobacterium sp. J3 (ΔG) of carbazole/thiabendazole: $-8.4/-7.0$ kcal mol $^{-1}$

Sphingomonas sp. KA1 (ΔG) of carbazole/thiabendazole: $-7.4/-6.6$ kcal mol $^{-1}$

Gene expression: interactions (network analysis – *Sphingomonas* subnetworks)

Network analysis



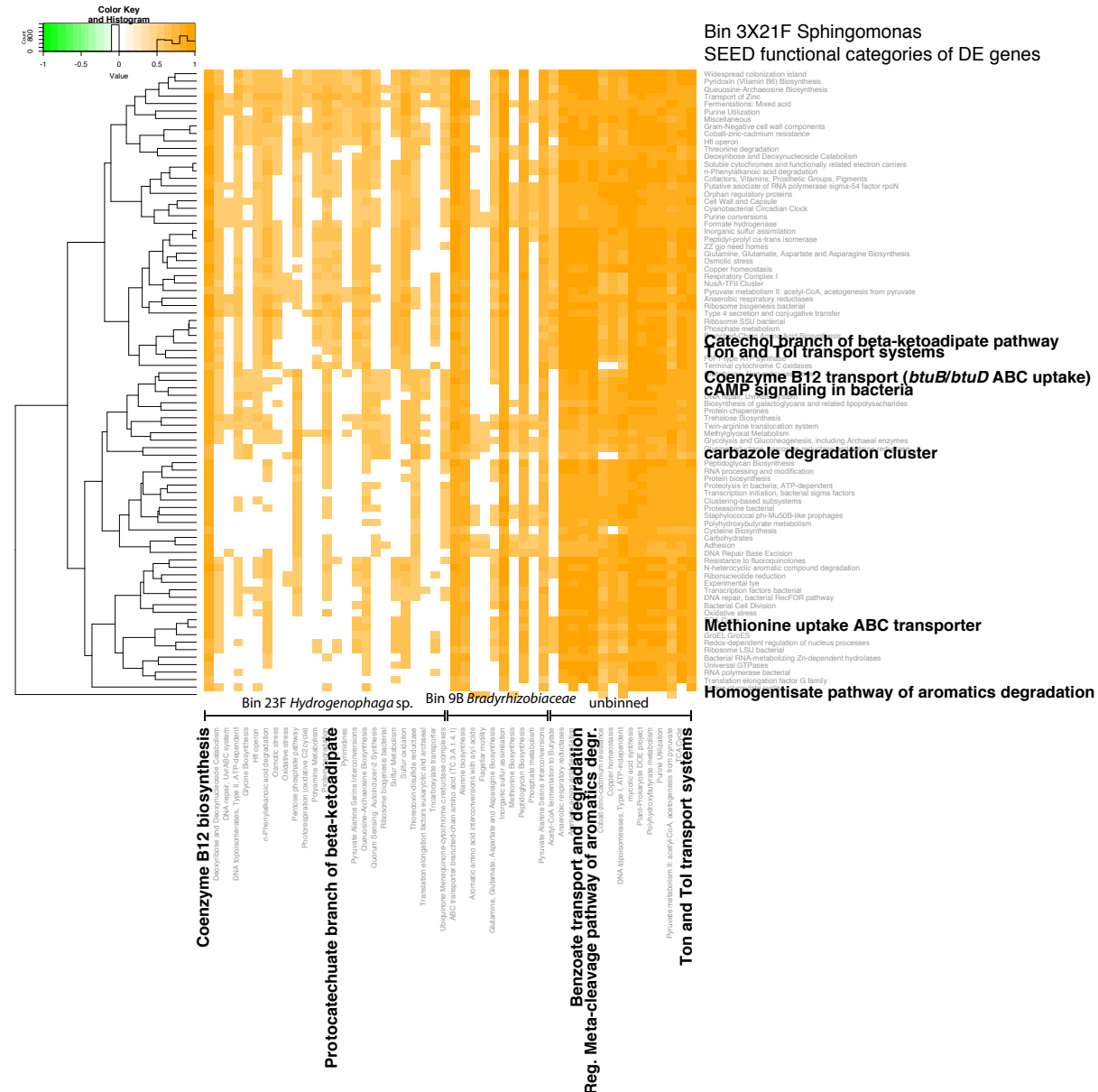
Sphingomonas MAG subnetworks



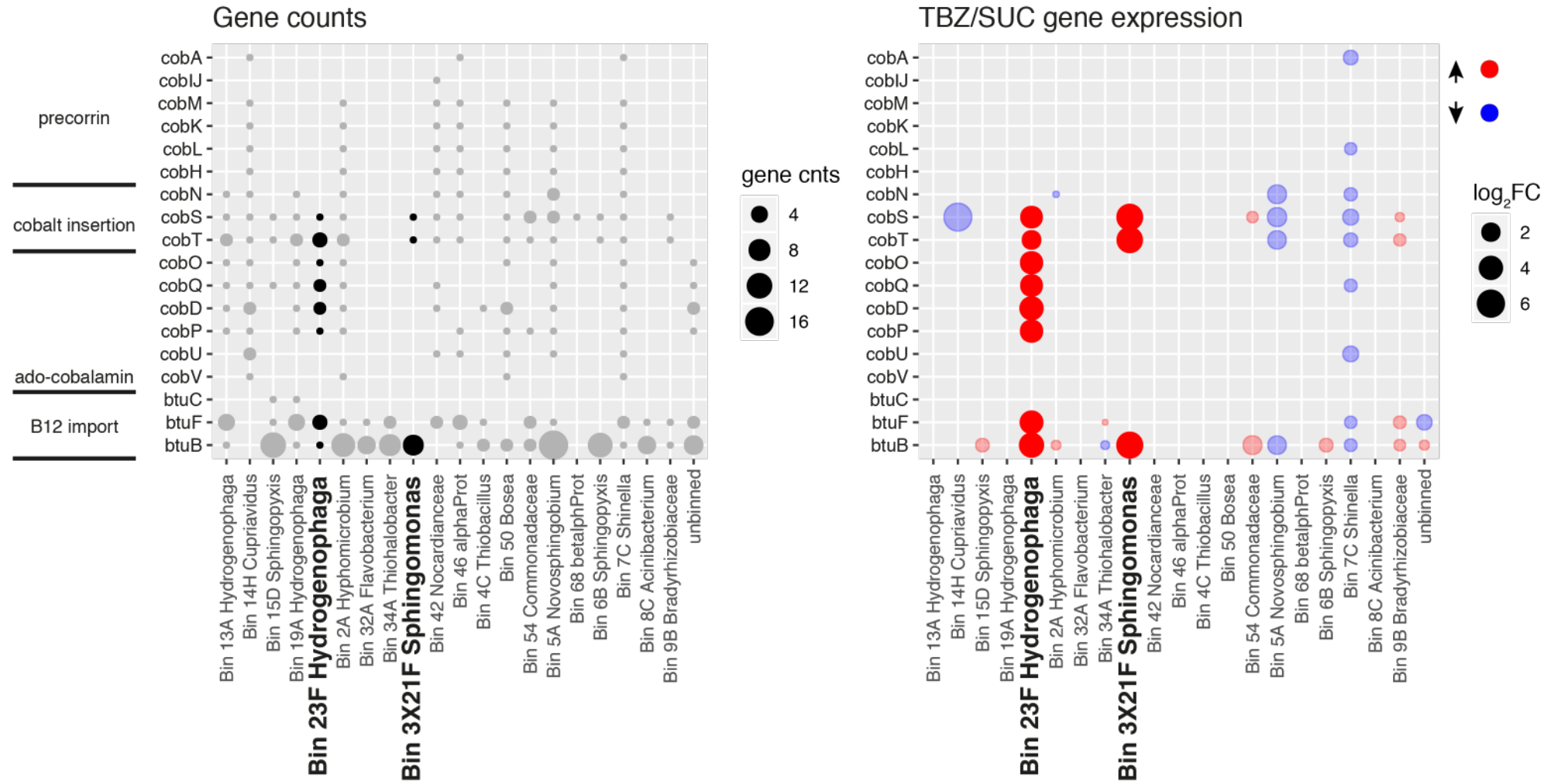
Correlations with *Hydrogenophaga*,
Bradyrhizobiaceae MAGs and unbinned contigs



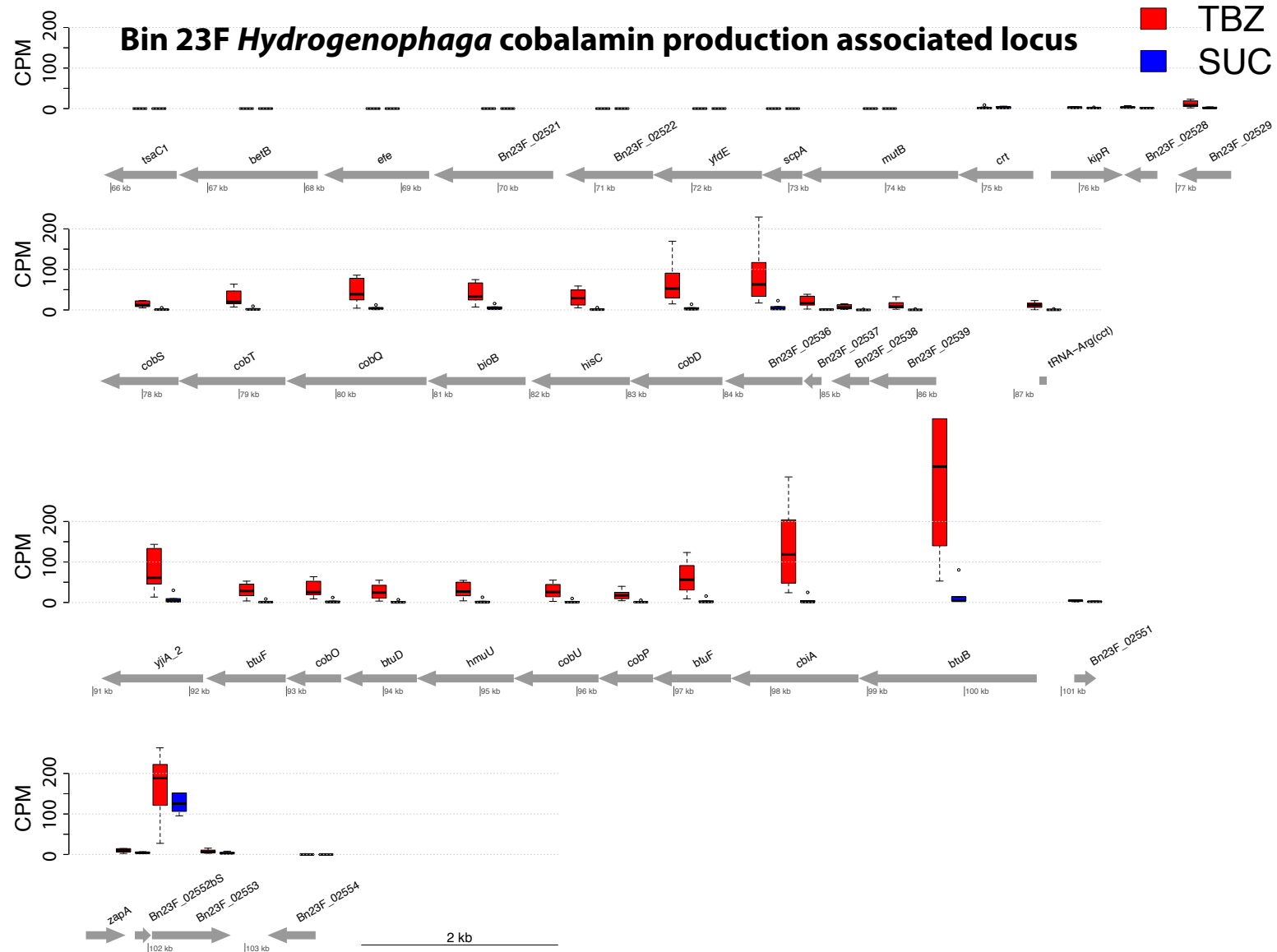
Consistent correlations of the *Hydrogenophaga*
 cobalamin production pathway with all DE genes
 (including Car/Cat pathways).



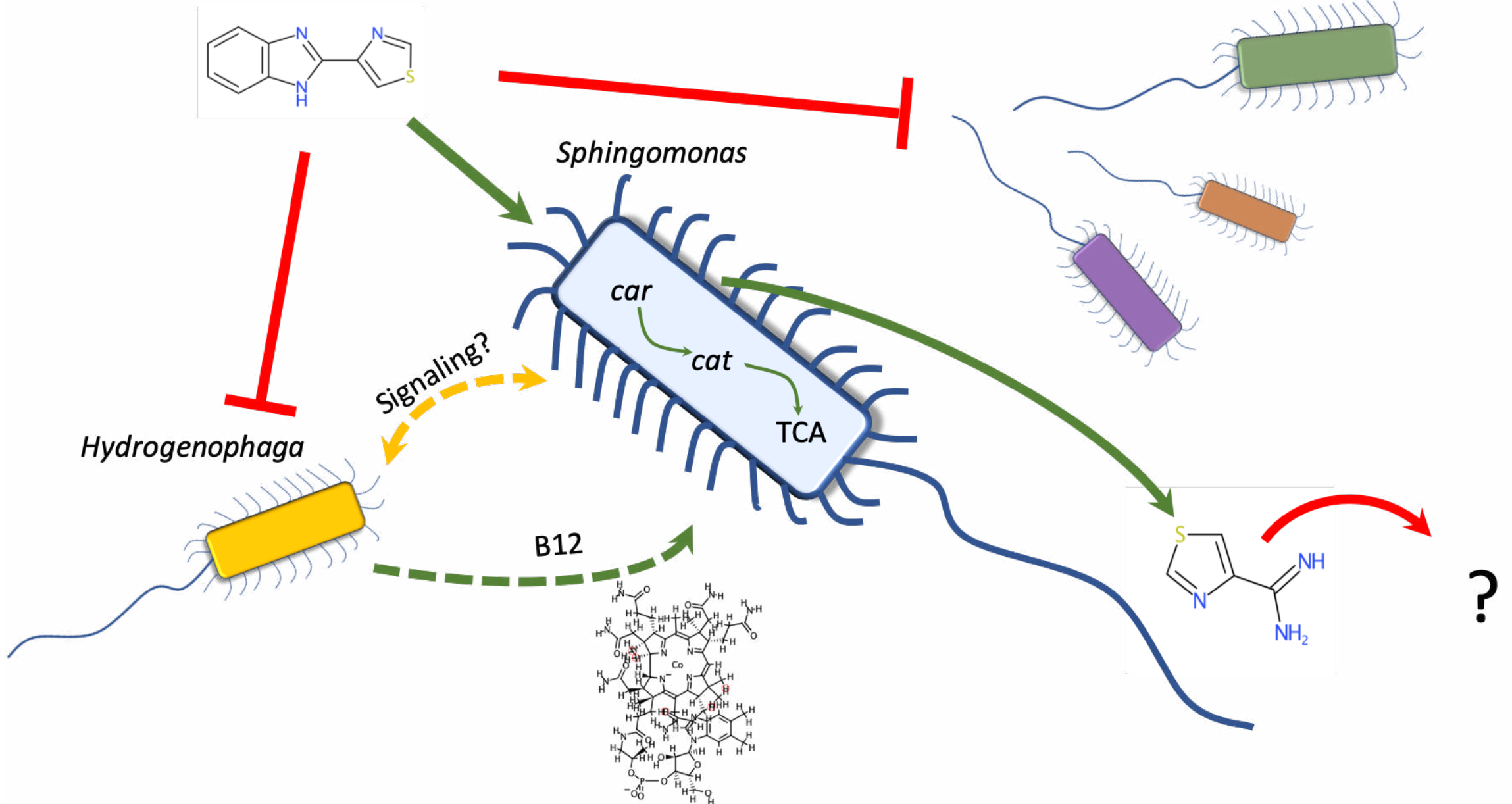
Cobalamin pathway completeness/expression



Gene expression profile



Summary and proposed model



Ongoing

- ✓ **Longer term experiment for TP degradation (Ana Agüera)**
- ✓ **Benchtop bioreactor study for real-world conditions (Spyros Ntougias)**
- ✓ **Hard evidence for the upper pathway (expression of key enzymes)**
- ✓ **Further *Sphingomonas* MAG refinement (SIP-based)**



UFZ Environmental Microbiology
Antonis Chatzinotas
Nicole Steinbach



UFZ Isotope Biochemistry
Lorenz Adrian
Benjamin Scheer



Dpt Chem. & Physics, Univ. of Almeria
Agüera Ana



Agr. Res. Inst. Of Cyprus
Michalis Omirou



Thank you!!!

Dimitrios G Karpouzas
Chiara Perruchon

