

***A Propionibacterium acnes* filogenetikai jellemzése új
molekuláris tipizálási módszerek kidolgozásával és egyes
törzsek lipáz aktivitásának meghatározása**

Ph.D. értekezés

Hunyadkürti Judit

Témavezető: Dr. Nagy István

Biológia Doktori Iskola

MTA SZBK Biokémia Intézet

SZTE TTIK

2014.

Szeged

TARTALOMJEGYZÉK

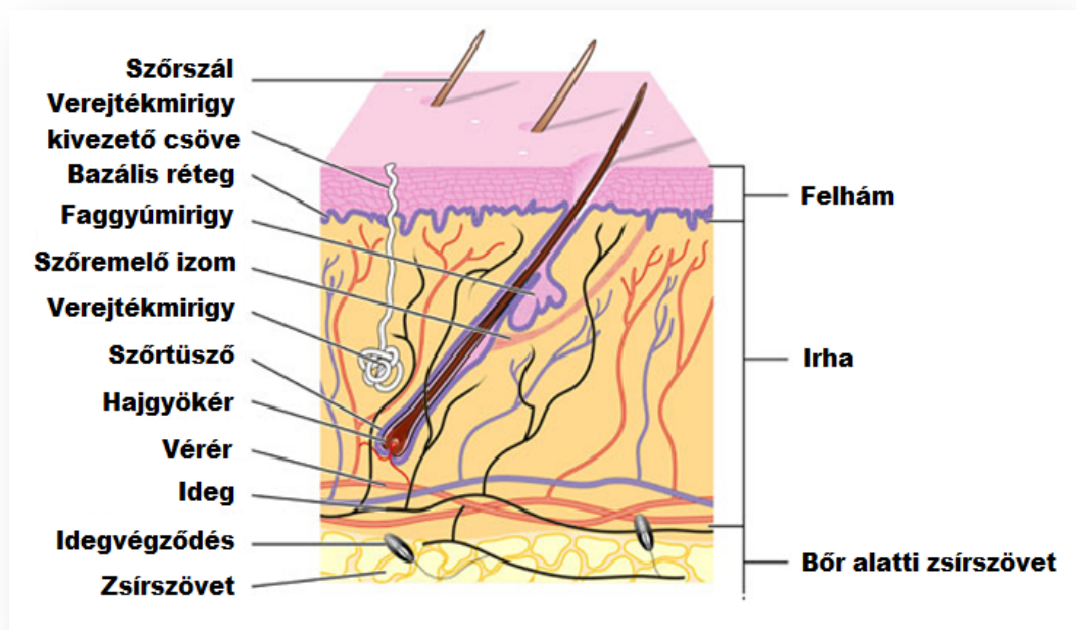
1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	1
1.1 Az emberi bőr felépítése	1
1.1.1 A hám	1
1.1.2 Az irha	3
1.1.3 A bőralja	4
1.2 A bőr mikroflórája	4
1.3 <i>Propionibacterium</i> nemzetség jellemzése	5
1.4 A kommenzalista és patogén <i>Propionibacterium acnes</i>	7
1.5 <i>Propionibacterium acnes</i> azonosítás és osztályozás	7
1.6 Az acne vulgaris etiológiája és kezelési lehetőségei.....	9
1.7 <i>Propionibacterium acnes</i> kölcsönhatása epidermális sejtekkel.....	14
1.8 <i>Propionibacterium acnes</i> feltételezett virulencia faktorai.....	17
2. CÉLKITŰZÉSEK	19
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	21
3.1 Felhasznált mikroorganizmusok és anyagok	21
3.1.1 Felhasznált mikroorganizmusok.....	21
3.1.2 Felhasznált táptalajok, tápoldatok	22
3.1.3 PCR során felhasznált primerek	23
3.1.4 Nukleinsav elválasztáshoz használt oldatok, reagensek.....	25
3.2 Alkalmazott módszerek	25
3.2.1 Baktérium törzsek tenyésztése, fenntartása	25
3.2.2 Teljes nukleinsav izolálása	25
3.2.3 <i>De novo</i> teljes genom szekvenálás	25
3.2.4 Azonosítási és osztályozási módszerek	26
3.2.5 Vékonyréteg kromatográfia.....	30
3.2.6 A PRP-38 törzs mutagenezise	31
3.2.7 Fluorometriás lipáz aktivitás meghatározása.....	32
3.2.8 Pásztázó elektronmikroszkóp	33
3.2.9 Ármalásos citometria.....	33
4. EREDMÉNYEK.....	34
4.1 <i>Propionibacterium acnes</i> azonosítási és osztályozási módszerek kifejlesztése	34
4.1.1 A törzsgyűjtemény jellemzése RAPD alkalmazásával.....	34
4.1.2 Multiplex PCR.....	35
4.1.3 eMLST.....	39
4.2 Filogenetika	41

4.3	Teljes genom szekvenálások.....	43
4.4	A III-as típusú filogenetikai csoport morfológiai jellemzése	45
4.5	MALDI-TOF MS analízis	49
4.6	Klinikai minták tipizálása	51
4.7	Triacilglicerol lipáz aktivitásának vizsgálata.....	54
4.8	PRP-38-as törzs mutagenezise.....	56
5.	EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA	60
6.	ÖSSZEFOGLALÓ.....	69
7.	SUMMARY	71
8.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	73
9.	IRODALMI HIVATKOZÁSOK	74
10.	FÜGGELÉK	85

1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1.1 Az emberi bőr felépítése

Az emberi bőr szervezetünk legnagyobb szerve, súlya elérheti testtömegünk 15%-át is. Elsősorban védelmi vonalként fő funkciója a szervezet környezettől való elhatárolása, ezáltal egy úgynevezett fizikai barrier kialakítása. Szerepe van továbbá az állandó testhőmérséklet és vízháztartás szabályozásában, valamint a kórokozók elleni küzdelemben, így az immunrendszerünk támogatásában is. Komplex funkciója speciális szerkezetének köszönhető. Struktúráisan 3 réteget különböztetünk meg; úgy mint a hámréteget (*epidermis*), az irharéteget (*dermis*) és a bőralját (*subcutis*) (Kolarsick, Kolarsick és mtsa. 2011). A dinamikusan megújuló hámréteget elsősorban a citokeratin termeléséért felelős sejtek, az úgynevezett keratinociták alkotják. A középső réteget egy rostos szerkezeti fehérje, a kollagén építi fel, míg a bőralja zsírlebenyeiben a lipociták foglalnak helyet.

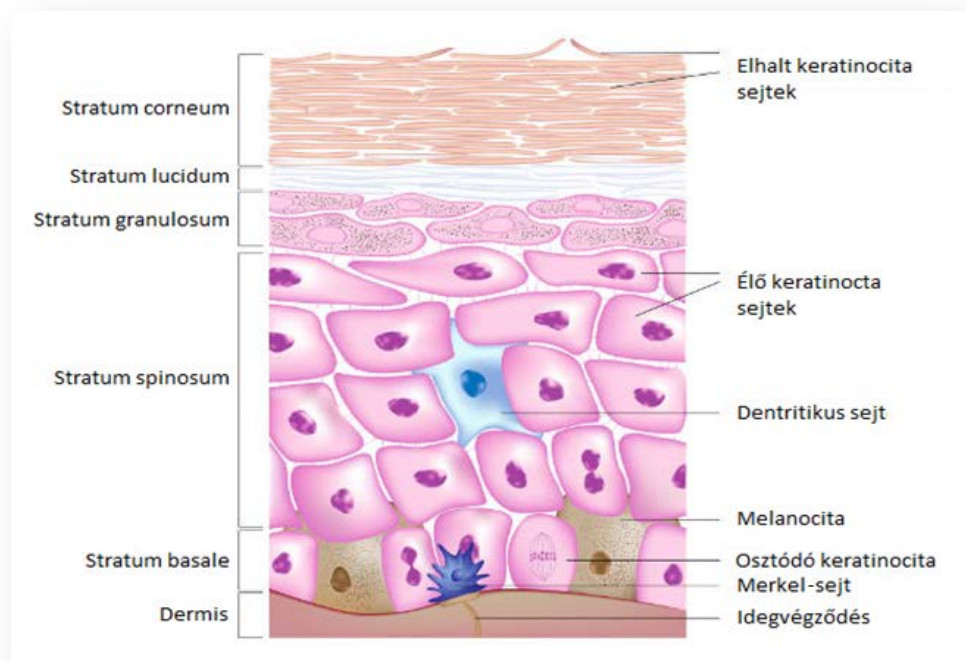


1. ábra. Az emberi bőr felépítése.

1.1.1 A hám

A többrétegű elszarusodó laphám kültakarónk legkülső rétege. Legnagyobb részét (90-95%) a citokeratint termelő, ektodermális eredetű keratinociták (KC) alkotják. A keratinociták mellett ~5%-ban megtalálhatóak dentritikus sejtípusok, mint a melanociták és a Langerhans sejtek, továbbá a mechanoreceptorként működő Merkel-sejtek. Az

epidermális sejtek folytonosan helyezkednek el a hám 5 rétegében (2. ábra). A keratinociták a differenciálódásuk során az alaprétégből (*stratum basale*) a bőr felszíne felé vándorolnak, miközben egy keratinizációs folyamaton esnek át. A keratinizáció eredményeként a keratinociták citokeratint termelnek, majd a végső stádiumban a legfelső szaruréteget kialakító (*stratum corneum*) korneocitákká differenciálódnak. Megjelenésük összefügg a hám rétegein belüli elhelyezkedéstől, így az elszarusodások során a fiatal, alaprétégben elhelyezkedő oszlopos sejtekből ellaposodott, poligon struktúra alakul ki.



2. ábra. A hám felépítése.

A melanociták elsősorban a bőr színének kialakításában vesznek részt, melanin pigment termelésével, amely a tirozináz enzim aktivitása révén valósul meg. Megnövekedett ultraibolya sugárzás (UV) hatására a melanin termelése növekszik, így a bőr színének kialakítása mellett szerepük van a káros sugárzások - a genetikai információ károsodása - elleni védelemben (Brenner és Hearing 2008).

A Merkel-sejt egy ovális alakú, lassan adaptálódó, neuroendokrin és epitéliális jellegekkel is rendelkező, funkciójára nézve I-es típusú mechanoreceptornak tekinthető, mely a tapintás érzékelésért felelős. A Merkel-sejtek a hám alaprétégében helyezkednek el, keratinocitákhoz dezmoszómáisan kapcsolódnak. Densitásuk testszerte változó: a tenyér és a talp területein a legmagasabb a számuk, így ott kisebb receptív mezővel rendelkeznek, de a tapintás érzékelésének a felbontása itt a legnagyobb. A szomszédos keratinocita relatív

kis stimulusa elegendő ahhoz, hogy a Merkel-sejtek kémiai szignált bocsássanak ki, ami a szomszédos afferens neuronban egy akciós potenciált generál, amely közvetítődik az agyba. Legfőképpen az ajkakon, a szájüregben és a szőrtüszők gyökerének külső falában helyezkednek el, sokszor úgynevezett tapintó lemezeket alkotva (Moll 1994).

További dentritikus sejt a Langerhans sejt, amely antigént prezentáló sejt típus és megtalálható a hám összes rétegében. Képes antigéneket felismerni, majd prezentálni a naív T-sejteknek. A hámiban 3-6%-ban fordulnak elő éretlen formában, majd érett sejtekké az antigén felismerése után válnak.

A hámrétegében megtalálható különböző függelékek a hám legfelső rétegéhez kapcsolódnak, de legfőképpen a dermiszben és a bőralfában lokalizáltak. Ilyen függelék a verejtékmirigy (*glandula sudorifera*), a faggyúmirigy (*glandula sebacea*), a haj és a köröm. Az ekkrin verejtékmirigyek a hőszabályozásban vesznek részt, így a talp és hát területein legnagyobb a sűrűségük. Az apokrin verejtékmirigy, illatanyagot termelő mirigyek a hónalj és a gát területeken fordulnak elő nagyobb sűrűséggel. A *pilosebaceous* egység magába foglalja a proximális részen a szőrtüszőt és disztálisan a holokrin elválasztású faggyúmirigyét. A szőrtüsző a kötőszövetes alapállományból, a hajszáלבól, a dermális papillából és gyökérhüvelyből épül fel. Az itt megtalálható szebociták termelik a neutrális lipidekben gazdag szébumot, amely a kiszáradás ellen nyújt védelmet (Kanitakis 2002).

1.1.2 Az irha

A bőr középső rétege az irha, egy összetett lazarostos kötőszövet, amelyben helyet foglalnak a dús ideg- és érrendszeri hálózatok, a hám eredetű függelékek, a fibroblasztok, a makrofágok és hízósejtek. Vastagsága jelentősen függ az anatómiai elhelyezkedésétől (hát, talp területeken vastagabb), azonban a bőr tömegének a legnagyobb részét az irha alkotja. Biztosítja a bőr rugalmasságát, véd a mechanikai sérülésektől, vízmegkötő tulajdonsággal rendelkezik és támogatja a hőszabályozást. Mindezekben felül megtalálhatóak benne a hő-, a fájdalom-, a nyomás- és a tapintás érzékelésben szerepet játszó receptorok.

Az irha alaprégét a fibroblaszt sejtek adják, melyek az alapállományt és a kötőszöveti rostokat termelik. Az bőr mechanikai sérüléstől való védelmét az irhában elhelyezkedő úgynevezett szerkezeti fehérje, a kollagén szolgáltatja. Legnagyobb arányban az I-es és III-as típusú kollagén építi fel az irha rétegét, amelyek kötegekbe rendeződve helyezkednek el, és vastagsága az irha mélyebb rétegein belül növekszik. Kémialag és

szerkezetileg különböző, mikrofibrillával borított, elasztikus rostok felelősek az irha rugalmasságáért (Cay M. Kielty 2002). A csontvelő eredetű ovális alakú hízósejtek az irha felszínéhez közel helyezkednek el, és bár kis mennyiségben, de a bőr legalsó rétegében is megtalálhatóak. A kötőszöveti I-es típusú és a II-es típusú nyálkahártya-hízósejtek felszínét ezernyi immunglobulin E receptor borítja be. Ily módon szerepet játszanak a paraziták elleni védelemben, az allergiás válaszreakció kialakításában, a gyulladás szabályozásában, és ezáltal a gazdaszervezet védelmében is (Urb és Sheppard 2012).

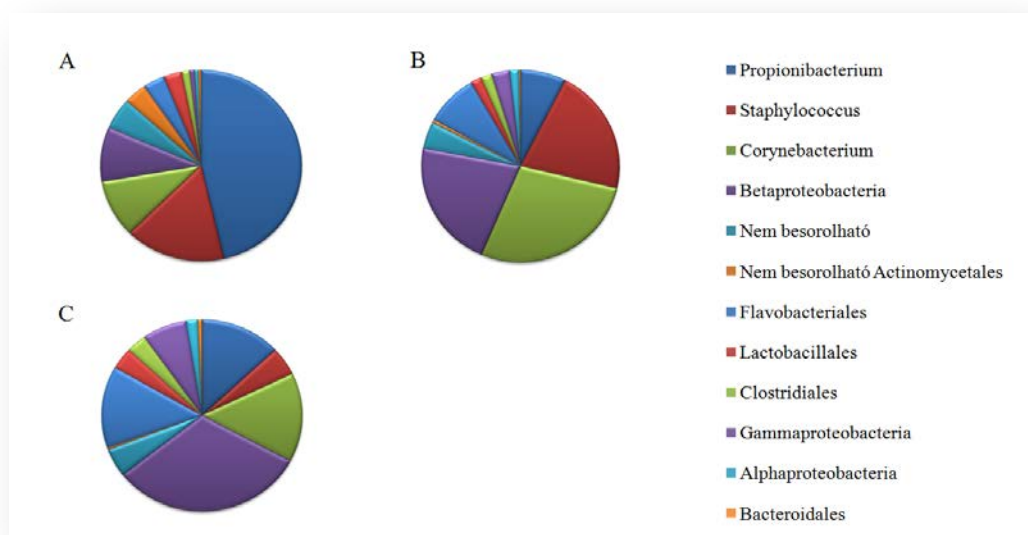
1.1.3 A bőralja

A bőr energiát szolgáltató zsíros kötőszöveti rétege a bőralja (*subcutis*). Legfőbb sejtalkotója a lebonyeokká rendeződött lipocita, amely a testsúly szabályozásában a leptin nevezetű hormon termelésével vesz részt. Ezekben a lebonyeokban erek és idegek futnak. A bőralja vastagsága testszerte és nemenként változó. A bőr rétegeinek táplálásán keresztül szerepe van az itt előforduló lipociták ösztrogén bioszintézisében is (Ronti, Lupattelli és mtsa. 2006).

1.2 A bőr mikroflórája

Az emberi bőrön számos mikroorganizmus található meg, ezek egy része kommenzalista, mások patogének, amelyek együttesen egy dinamikus közösséget alkotva alakítják ki az egyénre jellemző flórát. Az élőhely fizikai, kémiai tulajdonságai, a külső környezeti faktorok, - mint pl. kozmetikumok használata, higiénia – és a gazdaszervezet faktorai, - mint pl. kor, nem - egyaránt hatást gyakorolnak az emberi bőr mikrobióta összetételére. (Grice és Segre 2011). Mind a külső- és belső környezeti faktorok szelekciós nyomásként hatnak a mikroorganizmusokra, így az adott területen csak az adott feltételekhez adaptálódni tudó mikroorganizmusok élnek túl (Tagami 2008). Megállapítható, hogy minél nagyobb az adott terület elhatárolódása, annál kisebb az itt élő populáció diverzitása: pl. a lipidekben gazdag faggyúmirigyekben a lipofil *Propionibacterium* spp. (species), míg a szárazabb területeken a *Staphylococcus* spp. kolonizálnak nagyobb mértékben (3. ábra) (Costello, Lauber és mtsa. 2009). Így bőrünk, a mikroorganizmusokkal együttesen egy olyan ökoszisztémának tekinthető, amelyen fiziológiailag és topográfiaailag különböző niche-eket tudunk elkülöníteni. A niche-ek mikrobiótájának a jellemzése alapján elmondható, hogy *phylum* szinten az egyént kolonizáló mikroorganizmusok nagyon hasonlóak, szemben a faj és a törzs szintekkel, ahol a nagyfokú diverzitás jellemző.

Számtalan hipotézis felveti, hogy az emberi bőr mikrobiom összetételének megváltozása növelheti az esélyt az akut, valamint krónikus betegségek kialakulására, így napjaink egyik leggyakoribb bőrbetegségére, az acne vulgaris-ra is (Grice és Segre 2011).



3. ábra Az egyes élőhelyek (bőrfelület) diverzitásának az ábrázolása (Grice, Kong és mtsa. 2009 alapján) **A:** faggyúban gazdag terület, **B:** nedvesebb terület, **C:** száraz terület mikroorganizmus összetételét ábrázolja.

1.3 *Propionibacterium* nemzetség jellemzése

Az egészséges emberi bőrt leggyakrabban kolonizáló fajok a *Staphylococcus epidermidis*, *Malassezia furfur* és a *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*). Ez utóbbi egy Gram-pozitív, nem spórázó, anaerob, opportunista baktérium. Nevét a növekedése során nagy mennyiségben termelődő propionsavról kapta. A Propionibacteriaceae családban két nagy nemzetséget tudunk elkülöníteni. 1906-ban Orla-Jensen és Von Freudenreich által felfedezett propionsavat termelő, emmentáli sajtból izolált baktériumok, az úgynevezett “klasszikus” *Propionibacterium* nemzetségbe tartoznak (Von Freudenreich E. 1906). Az elsősorban anaerob coryneform organizmusként számontartott, bőrről izolált baktériumok számos tulajdonsága megegyezett a “klasszikus” *Propionibacterium*-éval, így Douglas és Gunter 1946-ban javasolta, hogy a *Corynebacterium acnes*-ként nevezett baktériumot nevezzék át *Propionibacterium acnes*-sé (Douglas és Gunter 1946). Így megalakult a *cutaneous*, azaz a bőrről származó *Propionibacterium*-ok nemzetsége. Megjelenésükben hasonlóak, de elmondható, hogy a *cutaneous* baktériumok vékonyabb megnyúlt formájúak, míg a “klasszikus” baktériumok inkább rövidebb és zömökebb külleműek.

A bőrről izolált baktériumok nemzetségébe tartozó baktériumok metabolizmusuk során nem termelnek mikolsavat, a diamino-sav a sejtfal peptidoglikánjában LL A₂-pm (6S, 2S diaminopimelin sav) konformációjú és a sejtfal poliszacharidjuk nem tartalmaz arabinózt. Növekedési pH optimumuk behatárolt 5,5-6,0 között mozog. Metabolikus vizsgálatok során fény derült a *P. acnes* azon képességére, hogy a megváltozott oxigénellátottságú körülményekhez adaptálódni tud: rendelkezik az oxidatív foszforilációhoz szükséges kulcsfontosságú elemekkel, továbbá a glikolízis és a pentóz-foszfát ciklus összes génje is megtalálható bennük (Ventura, Canchaya és mtsa. 2007). Anaerob körülmények között szén és energiaforrásként glükózt, ribózt, fruktózt, mannitolt, trehalózt, glicerolt és trigliceridet hasznosítanak (Bruggemann, Henne és mtsa. 2004).

A nemzetségbe tartozó további négy faj úgy mint a *Propionibacterium avidum* (*P. avidum*), *Propionibacterium granulosum* (*P. granulosum*), *Propionibacterium propionicum* (*P. propionicum*) és a *P. acnes* néhány jellemzőit a következő táblázat foglalja össze (1. táblázat).

	<i>P. acnes</i>	<i>P. avidum</i>	<i>P. granulosum</i>	<i>P. propionicum</i>
Élőhely				
Bőr	+++	+++	+++	-
Szem	+	-	-	+++
Száj	++	-	+	+++
Vagina	+	-	-	+
Metabolikus jellemzők				
Kataláz teszt	+	+	+	-
Indol produkció	+	-	-	-
Nitrát redukció	+	-	-	+
Esculin hidrolízis	-	+	-	-
Kazein hidrolízis	+	+	-	-
Maltóz, szukróz fermentáció	-	+	+	+

1. táblázat. Különböző *Propionobacterium* spp.-ek élőhelyének és metabolizmusának összehasonlítása. (Funke, von Graevenitz és mtsa. 1997; Stackebrandt, Cummins és mtsa. 2006) Jelmagyarázat: Élőhely: ++++: legoptimálisabbtól az elégségesig; metabolikus jellemzők: +: >90%-a a törzsek közül pozitív, -: 0-10%-a a törzsek közül pozitív.

1.4 A kommenzalista és patogén *Propionibacterium acnes*

A *P. acnes* a normál flóra tagja, azonban az, hogy opportunista baktériumként is jelen lehet, felveti a kérdést, hogy a gazdaszervezet számára mekkora előnyt jelent a baktérium jelenléte. Néhány tanulmány utal rá, hogy a baktériumnak valóban van jótékony hatása, és hozzájárul a normál egészséges bőr kialakításához (Bojar és Holland 2004). Legnagyobb mértékben a folliculusokban élnek, így az itt termelődő szébum lipidjeit hasznosítják energiaforrásként propionsav termelésre. A sav termelésével a környezet pH-ja csökken, ami megelőzheti egyéb patogének kolonizációját. A glicerol fermentációja során a keletkezett ecetsav, laktátsav és propionsav képes a methicillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* (MRSA) és a *Micrococcus luteus* növekedésének a gátlására (Shu, Wang és mtsa. 2013). A klasszikus nemzetségben már 1978-ben leírták az antimikrobiális hatású bakteriocin termelését, majd ezután a *P. acnes*ben egy bakteriocin szerű hatóanyagot, nevezetesen az acnecint (Fujimura és Nakamura 1978). Ez a szekretált acnecin a propionsavval együtt segítséget nyújthat a gazdaszervezet védelmében a kompetítorok ellen.

Ugyanakkor a *P. acnes* ismert szerepet tölt be a humán populáció mintegy 70%-át érintő krónikus gyulladással járó bőrbetegségben, nevezetesen az acne vulgaris kialakításában. Ezen felül posztoperatív és implantátumok általi gyulladással járó fertőzésekben is azonosították (Ahn, Ko és mtsa. 1996; Delahaye, Fol és mtsa. 2005). Részt vesz továbbá a szem különböző fertőzéseiben és fogfertőzésekben (Debelian, Olsen és mtsa. 1992; Clark, Kaiser és mtsa. 1999). Összefüggést találtak a baktérium és a SAPHO szindróma (synovitis-acne-pustulosis-hyperostosis-osteitis), a sarcoidosis és a prosztaták között (Schaefferbeke, Lequen és mtsa. 1998; Eishi, Suga és mtsa. 2002; Cohen, Shannon és mtsa. 2005).

1.5 *Propionibacterium acnes* azonosítás és osztályozás

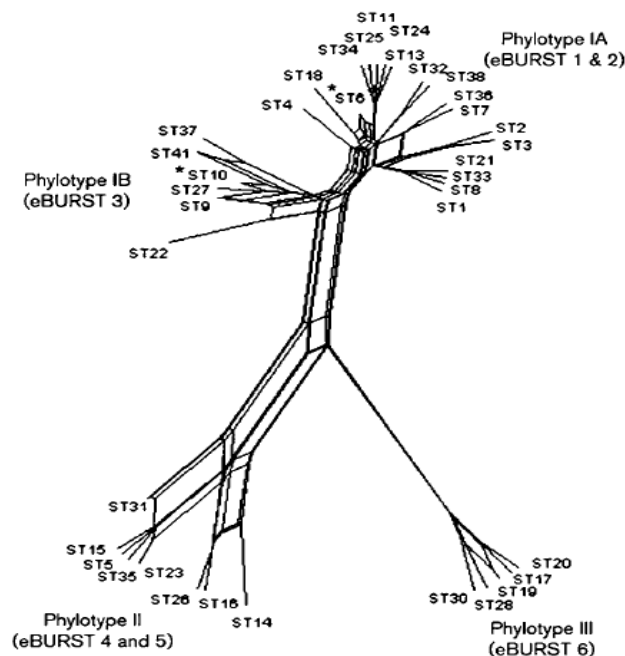
Az 1970-es évektől különféle módszereket fejlesztettek ki a *P. acnes* filogenetikai csoportosítására. Elsőként sejtfal cukor-összetétel analízis és agglutinációs teszt alapján Johnson elkülönítette az I-es és II-es filogenetikai csoportot. Megállapította, hogy az I-es csoport sejtfala mannózt, glükózt és galaktózt tartalmaz. Ez utóbbi a II-es filogenetikai csoportban hiányzik (Johnson és Cummins 1972). Továbbiakban fermentációs-és bakteriofág-alapú elkülönítés volt használatban, majd megjelentek a molekuláris PCR-

alapú technikák (Polimerase Chain Reaction) (Kishishita, Ushijima és mtsa. 1979). Így a *P. acnes* izolátumok más mikroorganizmusoktól való elkülönítése évekig a bakteriális 16S rDNS amplifikációjával és szekvenciájának meghatározásával történt, olyan univerzális primerek használatával, amelyek a gén egy nagyon konzervált, 1484 bázispár hosszúságú régióját célozzák meg (Kunishima, Inoue és mtsa. 2001). A magas fokú konzerváltság, valamint a vizsgált szekvencia rövidege azonban rendkívüli módon korlátozza az egyes törzsek közötti különbségek meghatározásának lehetőségét. Perry és munkatársai éppen a felbontás megnövelése érdekében, adaptálták a RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) módszert (Perry, Worthington és mtsa. 2003). A módszer random DNS szegmensek amplifikációján alapul, amelyeket egyetlen rövid (10 nukleotid hosszú) oligonukleotid primer segítségével amplifikálunk: mivel rendkívül rövid, az adott primer számtalan sense és antisense helyre képes bekötni a genomba. Az amplifikált termékek gélen való megfuttatása révén az eltérő mintázatot mutató törzsek elkülöníthetők egymástól. A RAPD előnye, hogy a hagyományos PCR alapú vizsgálatoktól eltérően, nem igényli a célszerkezet teljes genomjának ismeretét (Williams, Kubelik és mtsa. 1990). Hátránya azonban, hogy nem teszi lehetővé egyetlen bázisváltozás észlelését a genomi DNS-ben, mivel az amplifikáció nem mindig tökéletes párosodás eredménye a primer és a templát DNS között. Mivel a módszer nehezen reprodukálható és a RAPD markerek alacsony információtartalommal rendelkeznek, a módszer nem a legalkalmasabb a *P. acnes* filogenetikai analizésére (Nagy és Kemeny 2007).

A PCR alapú technikák után típus-specifikus monoklonális antitestek felhasználásával megerősítették, hogy az I-es és II-es csoport nemcsak fenotipikusan, hanem filogenetikailag is 2 külön csoportot alkot; továbbá a *recA* (PPA1012, háztartási gén) és *tly* (PPA1396, hipotetikus hemolizin gén) gének szignifikáns típus-specifikus polimorfizmust mutatnak, ami megfelel az immunfluoreszcens mérések alapján tapasztaltaknak (McDowell, Valanne és mtsa. 2005). További *recA* és egy CAMP faktor (Christin-Atkins-Munch-Peterson, hipotetikus ko-hemolízis faktor (Choudhury 1978)) alapú analízis során elkülönítettek az I-es filogenetikai csoportban egy további IB típust, majd egy atipikus sejtmorfológiával rendelkező III-as filogenetikai típust (McDowell, Perry és mtsa. 2008).

1998-ban a *Neisseria meningitidis* baktérium filogenetikai osztályozására dolgozták ki az úgynevezett Multi-lókus Szekvencia Tipizálási sémát (Multi-Locus Sequence Typing; MLST), amelyet azóta számos környezeti és patogén baktérium esetén

alkalmaztak. Laboratóriumunk részt vett az MLST *P. acnes*-re való adaptációjában, amely 7 konzervált háztartási gén részleges nukleotid szekvencia analízisén alapszik és lehetővé teszi az izolátumok molekuláris szinten történő összehasonlító jellemzését (McDowell, Gao és mtsa. 2011). Mivel a molekuláris tipizálás DNS szekvencia alapú, így könnyen reprodukálható és megbízható osztályozási rendszert biztosít. A módszer során a genomi DNS-ből az *aroE*, *atpD*, *gmk*, *guaA*, *lepA*, *recA* és *sodA* gének részleges szekvenciáit amplifikáljuk, majd kapilláris elektroforézis szekvenálással meghatározzuk a pontos nukleotid sorrendet. Az egyes allél kombinációk szekvencia típusokba (ST) sorolhatóak, amelyek segítségével 4 filogenetikai csoport (IA, IB, II, III) különíthető el (McDowell, Gao és mtsa. 2011).

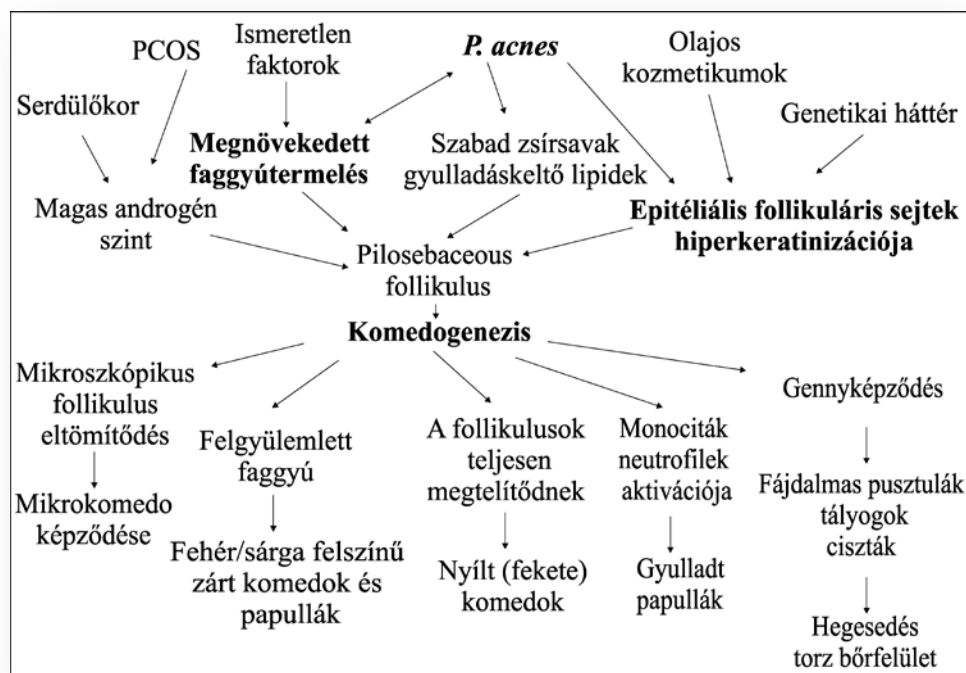


4. ábra. Távolság alapú osztott hálós grafikon. Többszörösen kapcsolt paralelogramma struktúra jelzi az esetleges rekombinációs kicserélődések lehetőségét (Huson és Bryant 2006). 123 izolátumból 37 ST-t tudunk elkülöníteni. A klonális populáció szerkezet vizsgálata során 6 eBURST csoportot különítettünk el, ami képviseli a 4 nagy filogenetikai csoportot. Az izolátumok 64%-a a ST6 (I-es típus) és ST10-es típusba tartoztak. A két csoport csillaggal jelölt az ábrán.

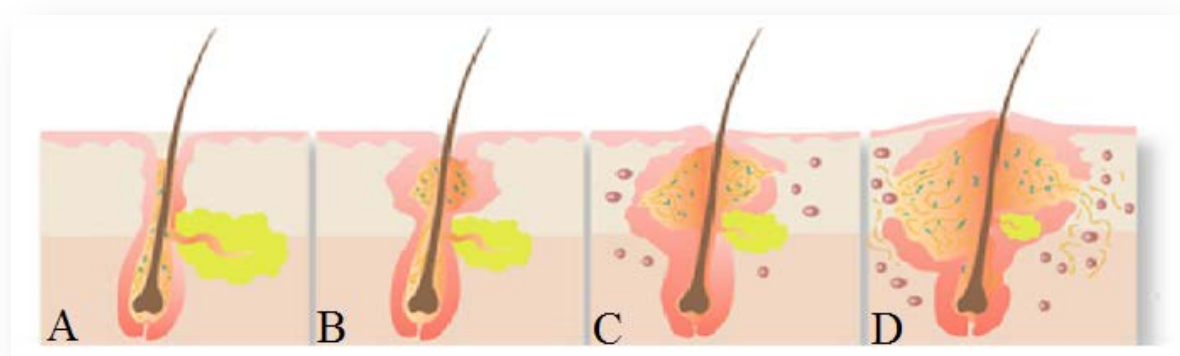
1.6 Az acne vulgaris etiológiája és kezelési lehetőségei

Az acne vulgaris multifaktoriális eredetű, a pilosebaceous egység krónikus gyulladással járó betegsége. Az iniciációjában részt vevő faktorok száma és természete, az események sora mindmáig tisztázatlan (Bojar és Holland 2004). Azonban már 1896-ban feltételezték, hogy a baktérium lehet a felelős az aknés elváltozásokért (Unna 1896). Az

1960-as évtől, miután felfedezték a baktérium jelenlétét az aknés léziókban és a normál egészséges bőrön, számos hipotézis merült fel az acne vulgaris patomechanizmusával kapcsolatban (Evans, Smith és mtsa. 1950; Leyden, McGinley és mtsa. 1975). Széles körben elfogadott, hogy négy fő tényező szükséges az acne vulgaris kialakulásához úgy, mint a megnövekedett faggyútermelés (seborrhea), komedogenezis, dukális keratinizáció és a *P. acnes* kolonizációja. Az 5. ábra foglalja össze az acne patomechanizmusának fő faktorait és mechanizmusait. Az ábra felső részén a lehetséges kiváltó okok láthatóak, mint a pubertás kor, *P. acnes* és különböző ismeretlen faktorok, melyek hatással vannak a megnövekedett faggyútermelésen és a follikuláris sejtek hiperkeratinizációján át a pilosebaceous follikulusra, ahol megindul a komedogenezis. Elsőként a sejttermelés és a faggyú mikroszkópikusan eltömíti a follikulusokat. A fokozatos faggyútermeléssel és a follikulusok eltömítődésével megjelennek a fehér/sárga felszínű zárt komedok, majd a teljes telítődés hatására a follikulusok kirepednek, oxidálódnak és fekete nyílt komedok képződnek. Ez idő alatt a kolonizáló *P. acnes* monocitákat és neutrofileket aktivál, megjelennek a gyulladáskeltő markerek és a kemoattraktánsok, amelyek újabb neutrofileket vonzanak a gyulladás helyszínére. Megindul a gennyképződés és fájdalmas papullák, pustulák, hegesedéssel járó ciszták és tályogok jelennek meg, amelyek sok esetben eltorzíthatják a bőr felszínét.



5. ábra. Az acne vulgarist kialakító lehetséges tényezők (Krowchuk 2000; Jappe 2003).



6. ábra Az acne patogenezisének illusztrációja (www.browskin.net) **A:** Epitéliális sejtek akkumulációja és keratintermelés. **B:** Megnövekedett faggyú- és keratin akkumuláció. **C:** Baktérium proliferáció és gyulladás. **D:** Markáns gyulladás és sebhely képződés.

A pilosebaceous folliculusokban helyet foglaló faggyúmirigyek - ezen belül az őket nagyrészt kialakító szebociták-fő feladata a faggyútermelés és kiválasztás. Az aknés elváltozások kialakulásának egyik fő faktora a megnövekedett faggyúszekréció, mely a corticotropint felszabadító hormonon és receptorán (CRH; CRH-R) keresztül valósul meg (Krause, Schnitger és mtsa. 2007). Az így megtermelődött faggyú kiváló tápanyagforrásként szolgál a *P. acnes* számára, ami így tovább tudja stimulálni a szebocitákat lipogenezisük fokozására (Beylot, Auffret és mtsa. 2013). Ezen felül a szebociták feladata, egy helyi androgén, a tesztoszteron szintézisének a szabályozása. Ennek a hormonnak a legfontosabb hatása az acne patogenezisében a szebociták és a keratinociták proliferációja/differenciációja. Továbbá a tesztoszteron szintéziséhez szükséges 5α reduktáz enzim megemelkedése szintén a keratinociták differenciációjához vezethet, ami a mikrokomedo képzés egyik meghatározó eleme. Az így kialakult mikrokomedok megjelenésével elindul a duktális keratinizáció és a komedogenezis. A folyamat során megjelennek a gyulladáskeltő citokinek, mint az IL-1 α (interleukin-1 α) és a TNF α (tumor nekrozis faktor- α). Ezúton a keratinocita egy visszacsatolást kap az IL-1 α által indukált retinsav-kötő II-es típusú fehérjén át a további differenciálódásra és a citokin a dermiszben nem specifikus gyulladással választ indít el. Mindezekon felül pedig fontos patogenitási tényező a *P. acnes* kolonizációja. A baktérium elsősorban a serdülőkorúak és a fiatal felnőttek olyan testfelületén kolonizál, amely gazdag faggyúmirigyekben, mint az arc-, homlok-, mellkas- és a hát bőrfelületei (Nagy és Kemeny 2007). Azonban nincs korreláció a baktérium denzitása és az acne vulgaris súlyossága között (Leeming, Holland és mtsa. 1988). Az, hogy a baktérium miként vesz részt az acne kialakulásában pontosan nem ismert, ugyanakkor valószínűsíthető, hogy részt vesz a

gyulladás kialakításában, vagy kölcsönösen a már gyulladt lézió nyújthat megfelelő környezetet a baktérium kolonizációjához. Következésképpen sokkal fontosabb az a környezet, amit a baktérium megteremthet saját maga számára, mint az abszolút denzitása. Egy hipotézis szerint, a baktérium elsőként exocelluláris enzimeket szekretál (lipáz, proteáz), így növelve a virulenciáját, majd az immunrendszer védelmét támadja a fagocitózis gátlásával (Jappe 2003).

Klinikai megjelenés szempontjából az aknés elváltozások három csoportba sorolhatók: 1) acne comedonica (vagy acne cosmetica): nyitott- és zárt komedók jellemzik, amelyek változó számban és intenzitásban jelentkeznek elsősorban az arc területén; 2) acne papulopustulosa (vagy acne agminata): a gyulladás előrehaladtával fájdalmas papullák jelennek meg, amelyek gyógyulás után gyakran hegeket, forradásokat hagynak maguk után; 3) acne conglobata (vagy acne fulminans): a legsúlyosabb forma, amelyet komedók, pustulák, megkeményedett papullák és tályogok jellemeznek kiterjedt bőrfelületeket érintve. Ez utóbbi esetében a hegek - amelyek nemcsak az arcon, hanem a háton és a tarkón is kialakulhatnak - igen szembetűnőek, jelentősen megváltoztatva az érintett bőrfelületek kinézetét (Rebecca Nguyen 2010).



7. ábra. Aknés elváltozások ((Williams, Dellavalle és mtsa. 2012) alapján) **A:** acne comedonica, ahol mind a fehér és a fekete felszínű komedok megjelennek. **B:** acne papulopustulosa, amelyet gyulladt papullák jellemeznek. **C:** acne conglobata, ahol kiterjedt gyulladt papullák és tályogok torzítják a bőr felszínét.

Az acne vulgaris kezelése során elengedhetetlen a megfelelő terápia kiválasztása. A tünetek súlyossága, a bőrtípus, a nem és az egyéb betegségek befolyásolhatják a kezelés elveit, ellenben mindig a 4 potenciális patogén tényezőt célozzák meg. Az alkalmazott terápia lehet topikális mono- vagy kombinált, illetve szisztémás mono- és topikális kombinált kezelés.

Az antikomedogén hatású topikális készítmények a folliculus keratinizációját - ezáltal a desquamációt - normalizálják és megelőzik az újonnan létrejövő mikrokomedo prekursor léziók kialakulását (pl. a retinoidok és az azelainsav) (Leyden 2003). A lokálisan alkalmazott retinoidok, az első generációs tretionin és az isotretionin használata limitált, ugyanis súlyos irritációt okoz, ezért mára már a poliaromás fejlesztésű adapalen van használatban (Webster 1998). Szisztémás szerekkel jól kombinálhatóak, azonban erősen teratogén hatásúak. Az azelainsav szinte az összes elvárt patogenitási tényezővel szembeni hatást ötvözi: antikomedogén, a *P. acnes* kolonizációját és a szabad zsírsavak mennyiségét csökkenti és direkt gyulladásgátló hatású. Kiválóan kombinálható, nem teratogén, bakteriális rezisztencia nem alakul ki ellene, illetve a gyulladás utáni hiperpigmentációt csökkenti (Webster 2000; Davis és Callender 2010). További kiegészítő lokális antikomedogén kezelési lehetőség a szalicilsav. Leginkább keratolitikus hatása van, de kis koncentrációban bakteriosztatikus és enyhe gyulladáscsökkentő hatása is van (Chantalat J. 2007). Súlyos klinikai tünetek esetén vagy egyéb kezelésre nem reagáló aknés lézióknál nélkülözhetetlen a szisztémás isotretionin és kombináltan a topikális szerek alkalmazása. Az isotretionin csökkenti a komedok képződését, megváltoztatja a folliculus mikrokozmoszát, ezáltal indirekt módon a *P. acnes* növekedését akadályozza és feltehetőleg a Toll-like receptor 2 (TLR-2) útvonalon át gátolja a gyulladást. Középsúlyos esetekben is előfordul az alkalmazása, melynek célja a tünetek kontrollálása, így kisebb dózisban a mellékhatása is csökken (Prevost és English Iii 2013).

A faggyútermelést szabályozó lokális készítmények forgalomban még nem kaphatóak; az 5 α reduktáz enzim szabályozásában vesznek részt (Rico 2013). Szisztémás faggyútermelés csökkenését antiandrogén kezeléssel lehet elérni, melyek között vannak ösztrogén tartalmú készítmények ill. androgénreceptor gátlószer. Akut súlyos elváltozások esetén rövid ideig glükokortikoidok használhatóak (Rebecca Nguyen 2010).

A helyileg alkalmazható antimikrobiális szereknek 2 csoportját különböztetjük el: az antibiotikumos és nem antibiotikumos készítmények. Lokális antibiotikumként eritromicin és klindamicin tartalmú krémeket alkalmaznak monoterápián, dacára annak, hogy az elmúlt 20 évben a bakteriális antibiotikum rezisztencia óriási mértékben megnövekedett. Ezért minden esetben kombinált terápiaiban kellene alkalmazni például cinkkel együtt, így megelőzhető lenne a rezisztencia ellenük (Dreno, Foulc és mtsa. 2005). Súlyos-középsúlyos esetekben szisztémás antibiotikumok, mint a tetraciklin, az eritromicin, a minociklin és a doxiciklin használatos. Az eritromicin és a tetraciklin szupresszálja a

leukociták kemotaxisát, míg a minociklin és a doxyciklin a citokinek felszabadulását gátolják így hozzájárulva a gyulladás csökkentéséhez. Az eritromicin a bakteriális rezisztencia kialakulása miatt mára a legkevésbé használt antibiotikum míg a leghatásosabbnak a minociklin bizonyult. Ajánlott kezelési időtartam 6-8 hét, hosszabb kezelés esetén elengedhetetlen más készítményekkel együtt történő használata, mint pl. lokális retinoidokkal vagy azelainsavval (Haider és Shaw 2004).

A gyulladás csökkentése helyileg főleg retinoidokkal történik, de a benzoil-peroxid is jól alkalmazható: jól kombinálható, gyulladáscsökkentő és antibakteriális hatású (Lookingbill, Chalker és mtsa. 1997). Alternatív terápia lehet a fotodinamikus kék fény illetve az UV-B fény kezelés (Sakamoto, Lopes és mtsa. 2010). Szisztémásan gyulladás csökkentésére főleg antibiotikumokat és retinoidokat használnak.

Kiegészítő terápiaként szükséges lehet a keletkezett hegek eltávolítása: ez kémiaailag alfa-hidroxisavakkal vagy szalicilsav nagyobb koncentrációban való alkalmazásával, továbbá dermabrasio vagy cryo-peeling technikákkal valósítható meg (Andrzej Kaszuba 2006).

1.7 *Propionibacterium acnes* kölcsönhatása epidermális sejtekkel

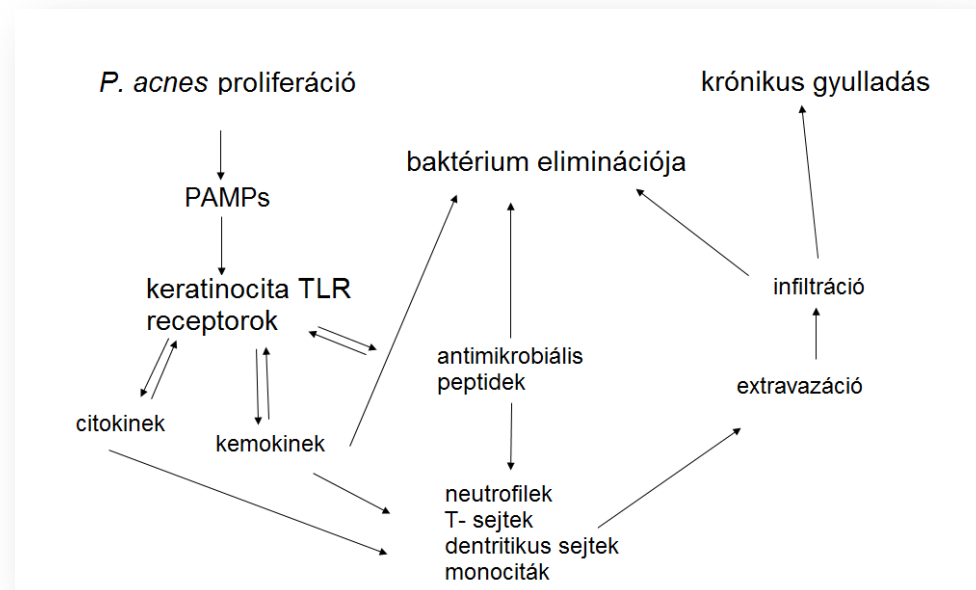
Az emberi szervezetben a környezetből állandóan a szervezetbe kerülő struktúrák folyamatos felismerése és a velük szembeni immunreakciók aktiválása nélkülözhetetlen folyamat. Ezeket a struktúrákat vagy antigéneket egy funkcionálisan érett adaptív immunrendszer ismeri fel, amely a törzsfajlás folyamán „ráépült” a természetes vagy másnéven veleszületett immunrendszerre, felhasználva annak a humorális és sejtes elemeit. A természetes immunrendszer sejtes és oldékony elemeinek a találkozása pl. a fertőzést okozó patogénekkal nem csak a szervezet első immunológiai védelmét aktiválja, hanem egyúttal az adaptív immunrendszer aktivációjának kezdeti lépését is jelenti (Turvey és Broide 2010).

A bőr legkülső rétegének, az epidermisznek 95%-át a keratinociták alkotják. Korábban úgy vélték, hogy ezek a sejtek kizárólag az epidermisz szerkezetének fenntartásában, citokeratinok termelésében játszanak szerepet, és fizikai akadályként funkcionálnak különböző exogén mikroorganizmusokkal szemben. Később azonban megfigyelték, hogy a keratinociták, valamint a szebociták immunológiailag aktív sejtek, amelyek képesek a veleszületett immunitás rendszerének elemeit aktiválni a mikroorganizmusokkal, vagy ligandjaikkal való stimulálás hatására (Pivarcsi, Nagy és

mtsa. 2005). Ahogyan számos más immunsejt, a keratinociták és a szebociták is expresszálják az ún. mintázatfelismerő receptorokat (Pattern recognition receptors; PRRs) mint pl. a Toll-szerű receptorok (Toll-like receptor; TLR). Ezek a sejtfelszíni vagy intracelluláris receptorok a kórokozók patogén-asszociált molekuláris mintázatait (Pathogen-associated molecular patterns; PAMPs) ismerik fel. A PAMP-ok közé soroljuk többek között, az elsősorban Gram-negatív baktériumok által expresszált lipopoliszacharidot (LPS) vagy a Gram-pozitív baktériumok sejtfalalkotóját a peptidoglikánt (PGN). Acne vulgarisban szenvedő betegeknél a TLR-2 és TLR-4 túltermelődése figyelhető meg az epidermisz felső rétegében. *In vitro* kísérletekben a *P. acnes* nemcsak a keratinociták, hanem a makrofágok TLR-2 kifejeződését is fokozza. A receptor-ligand keresztkötés következtében aktivált sejtek effektor molekulákat, pl. gyulladáskeltő- és gátló citokineket (pl. TNF- α , interleukin-10; IL-10) és kemokineket (pl. interleukin-8; CXCL-8) valamint antimikrobiális peptideket (pl. humán β -defenzin-2; hBD-2) szekretálnak (Pivarcsi, Nagy és mtsa. 2005). A szekretált hBD-2-nek a neutrofilekre kemotaktikus hatása van így hozzájárul a gazdaszervezet adaptív immunrendszerének szabályozásához (Niyonsaba, Ogawa és mtsa. 2004). Mivel a bőr strukturális sejtjei korántsem képesek olyan mennyiségű effektor molekulát termelni, mint pl. a professzionális immunsejtek (mint pl. a T-sejtek vagy a dendritikus sejtek) ezért félprofesszionális immunsejteknek tekinthetők, amelyek professzionális immunsejteket toboroznak a gyulladás területére (Nagy és Kemeny 2007). A bőr epidermiszében található dendritikus sejtek (Langerhans sejtek) állandó ellenőrzés alatt tartják a „behatolókat”. A nyirokcsomóba, illetve a lépbe vándorolnak, ahol a feldolgozott antigént mutatják be a T-sejteknek. További T-sejt differenciálódás és aktiváció során megindul a korokozó eliminációja. Az immunrendszer aktiválódott sejtjei a továbbiakban, a vérerek falának endothél sejtjeihez tapadnak, bekövetkezik az extravazáció. Az extravazációval folyamatosan lépnek ki az érpályából a gyulladás helyszínére elsőként a neutrofil granulociták majd a makrofágok (infiltráció) továbbá az aktivált fagocitasejtek gyulladásozó citokineket termelnek (IL-1, IL-6, TNF α) és kialakul a krónikus gyulladás (8. ábra).

Habár a félprofesszionális sejtek immunválasza lassúbb, és lényegesen kevesebb effektor molekulát képesek szekretálni, a kórokozók elleni harcban jelentős szerepet töltenek be. Az epidermális eredetű sejtek immunválaszának a specifikusságáért a különböző PRR kombinációkon keresztül aktiválódó jelátvivő útvonalak a felelősek. Az utóbbi évek kutatásai rávilágítottak, hogy az epidermális sejtek - eddig ismeretlen

molekuláris mechanizmuson keresztül - megtudják különböztetni a kommenzalistákat a kórokozóktól (Pivarcsi, Nagy és mtsa. 2005).



8. ábra. Immunfolyamatok a bőrben.

Habár az acne súlyossága és az adott területen található *P. acnes* sejtszáma közötti összefüggés máig vitatott, az utóbbi években elvégzett tanulmányok azt mutatják, hogy a *P. acnes* képes indukálni a keratinociták és szebociták proliferációját, differenciálódását valamint immunaktivációját (Pivarcsi, Nagy és mtsa. 2005; Nagy, Pivarcsi és mtsa. 2006; Nagy és Kemeny 2007). Fontos kiemelni ugyanakkor, hogy élő *P. acnes*-el történő fertőzést követően a keratinociták és a szebociták *in vitro* hBD-2, IL-8, IL-1 α és involucrin expressziója izolátum specifikus mintázatot mutat (Nagy, Pivarcsi és mtsa. 2005; Akaza, Akamatsu és mtsa. 2009). Amíg ugyanis a RAPD alapján (lásd később) IA filogenetikai típusba sorolt 889 és 2005 izolátumok jelentősen megemelték a keratinociták hBD-2 valamint involucrin expresszióját, addig az adott 2 gén kifejeződését sem az IB típusú 6609-es, sem a II típusú ATCC11828 törzs nem indukálta. Ezek az eredmények valószínűsítik, hogy az eltérő filogenetikai típusokba sorolt *P. acnes* törzsek eltérő genomjuk révén más-más molekulákat expresszálnak, ezáltal a gazda-sejtekkel (elsősorban az epidermális sejtekkel) való kölcsönhatásuk során a kommenzalisták esetében tolerogenitást, a patogének esetében gyulladást váltanak ki.

1.8 *Propionibacterium acnes* feltételezett virulencia faktorai

A *P. acnes*-t általánosságban véve egy gyenge virulenciájú baktériumként tartják számon, habár az információ a gazda-patogén kölcsönhatás viszonyáról mindmáig limitált a megfelelő genomszekvenciák ismerete miatt. Nagy áttörést jelentett a 2004-ben első teljes genom szekvencia megjelenése (Bruggemann, Henne és mtsa. 2004). A genom analízis során számos olyan gént detektáltak, ami részt vesz a sejt-sejt vagy sejt-mátrix kölcsönhatásban. Ezek a fehérjék jellegzetes 14-18 dipeptid prolin-treonin (PT repetitve protein, PTRP) ismétlődéseket tartalmaznak, ezenfelül a különböző *P. acnes* izolátumokban változó a kifejeződésük, továbbá dermatán-szulfát kötő aktivitással rendelkeznek (Lodes, Secrist és mtsa. 2006). A PTRP fehérjék és a külső sejtmembrán fehérjék sejt-fázis függő mintázatot mutatnak: ez tovább erősíti azt a felvetést, mely szerint a *P. acnes* képes a sejt-felszíni struktúrájának megváltoztatásával adaptálódni a különböző környezeti feltételekhez. Mindezek mellett 230 olyan gént azonosítottak, melyek kodon használata eltérő volt: hordozzák a horizontális géntranszfer nyomait. A gének 6 nagy és 11 kisebb „genomikai szigetbe” rendeződnek össze és vélhetően részt vesznek a baktérium virulenciájának a növelésében, mivel az azonosításuk során kiderült, hogy pl. a II-es ilyen csoportosulásban a Tra-típusú konjugációért felelős gének foglalnak helyet.

További genom analízis során számtalan gént azonosítottak, amelyek részt vesznek az eukarióta sejtek és sejt-tartalmuk degradációjában. Ilyen szekretált enzimek pl. a lipázok, a proteázok és a hialuronidázok (Hoeffler 1977). A *P. acnes* extracelluláris lipáza a GehA (glicerol-észter hidroláz A, PPA2105) enzim amely a faggyú trigliceridjeit hidrolizálja szabad zsírsavakká és glicerollá (Miskin, Farrell és mtsa. 1997). A glicerolt energiaforrásként hasznosítja, míg a szabad zsírsavak segítenek a sejtadhézióban a folliculus kolonizációjában (Gribbon, Cunliffe és mtsa. 1993; Falcocchio, Ruiz és mtsa. 2006). A faggyú túltermelődése során - ami egy kulcsfontosságú lépés az acne vulgaris patogenezisében - a baktérium számára egy tökéletes környezet jön létre, így a baktérium szekretált lipázát egy fontos virulencia faktornak tekintjük. További szekretált enzimek a hialuronát liáz (Steiner, Romero-Steiner és mtsa. 1997) (PPA380, EC4.2.2.1), amely katalizálja a hialuronsav degradációját: a hialuronsav fontos alkotóeleme az összekapcsolódó sejtek extracelluláris mátrixának. A hialuronsav degradációja során a TLR-4-es receptort targetálva a bomlástermékek gyulladási választ indukálnak mind makrofágokban és dentritikus sejtekben (Termeer, Hennies és mtsa. 2000; Black, Collins

és mtsa. 2013). Két újonnan felfedezett endoglikoceramidáz (PPA644, PPA2106) az oligoszacharidok és a ceramidok közti glikozidos kötést hasítják a glikoszfingolipidekben, mely utóbbi egy nélkülözhetetlen sejtalkotó. Egyéb extracelluláris enzime a szialidáz enzim (PPA684), amely a szialogliko-konjugátomuk hidrolízise során szíálsavat hoz létre (Nakatsuji, Liu és mtsa. 2008). A keletkezett szíálsav pedig kitűnő energia- és szénforrás a baktérium számára. Öt gén a *P. acnes* genomban egy a *Staphylococcus aureus* co-hemolítikus faktorához nagyon hasonló CAMP (Christie-Atkins-Munch-Peterson) faktort kódol. A szekretált fehérjék az eritrociták hemolízisét hajtják végre szfingomielináz C segítségével, továbbá pórusokat formálnak az eukaritóá sejtek membránjában (Lang és Palmer 2003). Habár *P. acnes*-ben a CAMP faktorok kifejeződése különböző a filogenetikai csoportok között (Valanne, McDowell és mtsa. 2005) mégis potenciális virulencia faktorként van számontartva. Mindezekon felül extracelluláris vagy membrán kötött cukordegradáló enzimek (pl. PPA363, PPA1683), szubtilizin típusú proteáz (PPA598) és tripeptidil aminopeptidáz (PPA247) enzimek is jelen vannak.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Az emberi bőr szervezetünk első számú védelmi vonala, amely megvédi a szervezetet többek között a káros környezeti behatásoktól, mint például a mechanikai sérülésektől és a kórokozóktól. A bőrön számos mikroorganizmus megtalálható, ezek egy része kommenzalista, mások patogének, amelyek együttesen egy dinamikus közösséget alkotva alakítják ki az egyénre jellemző flórát. Számptalan hipotézis felveti, hogy e közösség populációi arányának az „eltolódása” növelheti az esélyt az akut, valamint krónikus betegségek kialakulására, így napjaink egyik leggyakoribb bőrbetegségére, az acne vulgaris-ra is.

Az egészséges emberi bőrt leggyakrabban kolonizáló fajok a *Staphylococcus epidermidis*, *Malassezia furfur* és a *Propionibacterium acnes*. Ez utóbbi egy Gram-pozitív, nem spórázó, anaerob, opportunista baktérium. Legtöbbször az acne vulgaris-sal hozható összefüggésbe, de számptalan más súlyos lefolyású betegségben is szerepet játszik, mint például a szaruhártyafekély, szív-belhártyagyulladás, sarcoidosis, ízületi hártya gyulladása, hyperostosis és osteitis. A felsorolt betegségek patogenezise és ezen belül a *P. acnes* pontos szerepe máig nem ismert. Az idült gyulladással járó acne vulgaris legtöbbször a faggyúmirigyekben gazdag területeken jelentkezik, mint az arc, mellkas és a hát. Klinikai szempontból 3 formáját különböztetjük meg: acne comedonica, acne papulopustulosa és acne conglobata. Az acne vulgaris különböző formái általában jól kezelhetők antibiotikum készítményekkel, azonban - mint számos más mikroorganizmus is - a *P. acnes* is rezisztenssé válik az antibiotikumokra.

Bőrünk, mint legnagyobb szervünk a dinamikus közösséget alkotó mikroorganizmusokkal együttesen egy olyan ökoszisztémának tekinthető, amelyen fiziológiailag és topográfiaailag különböző niche-eket tudunk elkülöníteni. Annak érdekében, hogy jobban megismerjük és elkülönítsük a kommenzalista, valamint a potenciálisan patogén, illetve antibiotikum rezisztens törzseket, nélkülözhetetlen a bőr mikroöimjának a jellemzése.

Mindezek ismeretében munkacsoportunk az alábbi célokat tűzte ki:

1. Olyan meghatározási és osztályozási módszerek kidolgozása, amelyek megkönnyítik és gyorsítják a *Propionibacterium acnes* klinikai azonosítását.
2. Az általunk kifejlesztett azonosítási és osztályozási módszerek adatait felhasználva filogenetikai analízisek elvégzése.
3. Különböző *P. acnes* izolátumok teljes genomjának meghatározása, mellyel fel tudunk fedni olyan specifikus régiókat, az antibiotikum rezisztenciáért, virulenciáért és morfológiai különbségekért felelős faktorokat, melyek egy bizonyos törzsre jellemzőek.
4. A *P. acnes* újonnan leírt, a harmadik filogenetikai csoportba tartozó törzs morfológiai és áramlásos citometriás vizsgálata annak eldöntésére, hogy az atipikus fenotípust mutató sejt a sejtosztódás során szétválni nem tudó sejtek csoportja vagy egyetlen megnyúlt sejt.
5. A kifejlesztett azonosítási módszereinket alkalmazva egészséges egyének és aknés betegek bőréről izolált *P. acnes* törzsek jellemezése, így felderíteni a *P. acnes* kolonizációjának dinamikáját intra- és interperszonális szinten.
6. A máig ismert összes *P. acnes* filogenetikai törzs triacilglicerol lipáz aktivitásának vizsgálata vékonyréteg kromatográfiás módszerrel annak érdekében, hogy kiderítsük a szekretált hidrolitikus enzim szerepét a baktérium patogenitásában.
7. Mivel máig nincs a *P. acnes*-re használható gén kiütési módszer, ezért egy hatékony és reprodukálható génmanipulációs rendszer megtervezése és alkalmazása egy acne vulgarisból izolált patogén törzsön, majd a létrehozott törzs hidrolitikus jellemzése.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1 Felhasznált mikroorganizmusok és anyagok

3.1.1 Felhasznált mikroorganizmusok

RAPD analízis

Propionibacterium acnes törzsek:

IA típus: PRP-60, 157256, 317669, 226, 434, PRP-38, 33257
 IB típus: 6609, 51318, 887674
 II típus: ATCC11828, PRP-47, 299038, 7751723, 10281614,
 10334913
 III típus: Asn12, 12S

Propionibacterium avidum törzsek:

87229417, 9880, 33810, 440671

Multiplex PCR

IA₁ típus: hdn-1, PRP-60, M7
 IA₂ típus: P.acn33, P.acn17, P.acn31
 IB típus: 4/4/7, VA3/4, M3
 IC típus: PRP-38, PV66, 5/1/3
 II típus: ATCC11828, VA2/9N, M20
 III típus: 12S, Asn12, Asn10

Kolónia PCR-ben felhasznált törzsek:

IA₁ típus: L1958, W633, PV40
 IA₂ típus: 1A, 10S, 12C
 IB típus: Asn40, Asn55, Asn86
 IC típus: PRP-38, 5/1/3, 5/1/5
 II típus: SG2, ATB1, ET1
 III típus: 12S, 17S, 20C

eMLST (expanded Multilocus Sequences Typing)

IC típus: 5/1/3

Vékonyréteg kromatográfia:

IA ₁ típus:	PRP-60
IA ₂ típus:	P. acn17, P.acn31, P.acn33
IB típus:	6609
IC típus:	PRP-38; PRP-38/D4 (mutáns)
II típus:	ATCC 11828
III típus:	12S

Fluorometriás hidrolitikus aktivitás mérés

IC típus:	PRP-38
IC típus:	PRP-38/D4

Áramlásos citometriás mérés és pásztázó elektronmikroszkóp

IA ₁ típus:	PRP-60
III típus:	12S

3.1.2 Felhasznált táptalajok, tápoldatok**Véres–agar táptalaj**

4% Columbia agar
2,5% Defibrinált marhavér
1,2% Lizált marhavér
0,36 g/ml L-cisztein
1 mg K-vitamin
5% Dextróz

LB (Luria-Bertani) táptalaj

1% NaCl
1% Tripton
0,5% Élesztő kivonat
1,5% Agar

LB (Luria-Bertani) tápoldat

1% NaCl
 1% Tripton
 0,5% Élesztő kivonat

BHI (Brain-Heart-Infusion) tápoldat

3% BHI kivonat
 10% Élesztő kivonat
 0,5% Hemin 1 M-os NaOH-ban oldva
 1 mg K-vitamin

3.1.3 PCR során felhasznált primerek**RAPD**

1254: 5'-CCGCAGCCAA-3'

Multiplex PCR

PArA-1 forward: 5'-AAGCGTGAGTGACGGTAATGGGTA-3'
 PArA-2 reverse: 5'-CCACCATAACGTGCTGGCAACAGT-3'
 PAABC-1 forward: 5'-GCGTTGACCAAGTCCGCCGA-3'
 PAABC-2 reverse: 5'-GCAAATTCGCACCGCGGAGC-3'
 PASo-3 forward: 5'-CGGAACCATCAACAAACTCGAA-3'
 PASo-4 reverse: 5'-GAAGAACTCGTCAATCGCAGCA-3'
 PAHvp-1 forward: 5'-AGGGCGAGGTCCTTCTACCAGCG-3'
 PAHvp-2 reverse: 5'-ACCCTCCAAGTCAACTCTCCGCCT-3'
 PAAAt-1 forward: 5'-TCCATCTGGCCGAATACCAGG-3'
 PAAAt-2 reverse: 5'-TCTTAACGCCGATCCCTCCAT-3'
 PARcA-1 forward: 5'-GCGCCCTCAAGTTCTACTCA-3'
 PARcA-2 reverse: 5'-CGGATTTGGTGATAATGCCA-3'

eMLST

Lókuszok: aroE forward: 5'-ACCGATTAAGAGTGACTACC-3'
 aroE reverse: 5'-ACTCCTCGGAAATCTCTACA-3'

atpD forward:	5'-CCCTCCTTCTTCATCTTGT-3'
atpD reverse:	5'-ACAACAATTACCCCGAGA-3'
gmk forward:	5'-CTTGAGATTGCCCTAACC-3'
gmk reverse:	5'-TTCAGGGGTGGTCTCAGTC-3'
guaA forward:	5'-ATGCGAGTCGAGATCTTTT-3'
guaA reverse:	5'-TCGCCTTCATGGAACAAC-3'
lepA forward:	5'-TCGATATATGAGGGAGCAG-3'
lepA reverse:	5'-CCGGATTTCCACTCGATCA-3'
sodA forward:	5'-AAAAATCTCGAAACACGG-3'
sodA reverse:	5'-GATGGTGAACGAGTGCTTG-3'
Gének: <i>tly</i> forward:	5'-CAGGACGTGATGGCAATGCGA-3'
<i>tly</i> reverse:	5'-TCGTTCACAAGACCACAGTAGC-3'
<i>camp2</i> forward:	5'-ATCGTAGCCATACACCACACG-3'
<i>camp2</i> reverse:	5'-GCACCGAGTGTTGATGTCAATTAGC-3'

Mutagenesis során felhasznált primerek

Deléció kazetta elemei:

A forward: 5'-GCACCAGCGCGGCGTCAC-3'

A reverse: 5'-GGAGTCACTGATGGTGCTCAACGCCCTCGATCC-3'

C forward: 5'-GTTGAGCACCATCAGTGA CTCTCAGCGGAACAC-3'

C reverse: 5'-ATCGGGCTGGAGATGACTGG-3'

Univerzális plazmid primerek:

Opseq: 5'-TGTGTGGAATTGTGAGCGG-3'

Univ: 5'-TCGTGACTGGGAAAACCCTGGC-3'

KmR forward: 5'-CCGGCCGCTTGGGTGGAGAG-3'

KmR reverse: 5'-CAGGTAGCCGGATCAAGCGTATGC-3'

Deléció mutáns ellenőrző primerek:

forward: 5'-ACGCCGTTACCGGAATAC-3'

reverse: 5'-AACATGACCGTGCAGGAC-3'

3.1.4 Nukleinsav elválasztáshoz használt oldatok, reagensek

Agaróz gél:	10 mM dinátrium-tetraborát puffer
	1% vagy 2% agaróz
	1 µg/ml etídium bromid
„Loading” puffer:	30% szacharóz
	0,01% brómfenolkék
Molekulasúly markerek:	1 kb, 100 bp és 50 bp
	DNS molekulasúly létra (Fermentas)

3.2 Alkalmazott módszerek

3.2.1 Baktérium törzsek tenyésztése, fenntartása

Az összes baktérium törzsünket anaerob véres agar táptalajon növesztettük 37 °C-on, 3-5 napig, 10% H₂-t, 10% CO₂-ot, 80% N₂-t tartalmazó anaerob kamrában. A törzsek replikátumait -80 °C-on BHI tápoldatban tároltuk, amely 12% (v/v) glicerolt tartalmazott.

3.2.2 Teljes nukleinsav izolálása

Kettő ml 24 órás tenyészetből centrifugálással kiülepítettük a sejteket (10 perc, 3000 rpm), a felülúszót eltávolítottuk, majd 20 mg/ml lizozim enzimes oldattal 37 °C-on 1 órán át tártuk fel a sejteket, végül centrifugálással kiülepítettük a feltáródott sejteket. A genom DNS tisztítást az Aqua-Genomic Kit (MultiTarget Pharmaceuticals) felhasználásával végeztük a gyártó leírása szerint. Röviden, 200 µl Aqua Genomic kit oldatában felfuszpendáltuk a feltáródott sejteket, majd 90 °C-on 30 percig folyamatos rázatás mellett inkubáltuk őket. Ezt követően centrifugálással (15 perc, 13000 rpm) a sejttörmeléket eltávolítottuk, majd a felülúszóból 70 v/v%-nyi izopropanollal kicsaptuk a gDNS-t. Háromszori 75% etanollal történő mosás után a kinyert nukleinsav mennyiségétől függően 50-70 µl bidesztillált vízben felfuszpendáltuk a pelletet, majd NanoDrop-al (Thermo Scientific) és/vagy Qubit fluoriméterrel (Life Technologies) meghatároztuk a gDNS koncentrációt.

3.2.3 *De novo* teljes genom szekvenálás

Minden törzs esetében nagy mennyiségű és tisztaságú gDNS-t preparáltunk (lásd. fentebb) majd SOLiD (Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection) szekvenáló rendszer segítségével határoztuk meg a nukleotidsorrendjüket. Elsőként a szekvenáláshoz

adapterekkel ellátott mate-pair könyvtárat készítettünk. Ezután egy emulziós PCR-ben gyöngyökre felkötöttük és felamplifikáltuk a DNS fragmenteket. A gyöngyök dúsítása után a speciális szekvenáló primereket a gyöngy adaptereihez hibridizáltattuk, majd a négy fluoreszcens jelölt két bázist tartalmazó próbával ligálást végeztünk. A szekvenálás során kapott fragmenteket Genomics Workbench 4.8 (CLC Bio) és Omixon Gapped Alignment plug in (Omixon) szoftverek segítségével analizáltuk. A lefedetlen szakaszok szekvenciáit PCR reakciók és Sanger szekvenálás segítségével határoztuk meg. A genomok annotálása az NCBI (National Center for Biotechnology Information) Prokaryotic Genomes Automatic Annotation Pipeline (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/static/Pipeline.html>) felhasználásával történt.

3.2.4 Azonosítási és osztályozási módszerek

RAPD

Reakcióelegy (20 µl végtérfogatban):

- 4 µl 5x puffer
- 2 µl 10 mM dNTP mix
- 2 µl 10 mM MgCl
- 1 µl templát gDNS (50 ng/µl)
- 0,2 µl Go Taq Polimeráz (Promega)
- 1 µl 100 pM RAPD primer

A PCR program lépései:

1. elődenaturáció: 94 °C 4,5 perc
2. denaturáció: 94 °C 30 mp
3. annealing: 20 °C, 2 perc
4. polimerizáció: 72 °C, 2 perc
5. 2-4 lépések megismétlése 5 alkalommal
6. denaturáció: 94 °C 30 mp
7. annealing: 32 °C, 1 perc
8. polimerizáció: 72 °C, 2 perc
9. 6-8 lépések megismétlése 35 alkalommal
10. utópolimerizáció: 72 °C, 5 perc

Az amplikonokat alacsony áramerősséggel 2%-os agaróz gélen választottuk el.

Multiplex PCR

Reakcióelegy (10 µl végtérfogat):

- 2 µl 5x puffer
- 0,1 µl 25 mM dNTP mix
- 0,3 µl 50 mM MgCl
- 0,1 µl Go Taq Polimeráz (Promega)
- 6,4 µl primer-mix
- 1 µl templát DNS (50 ng/µl gDNS vagy kolónia PCR esetén:
- 40 µl desztillált vízben felfuszpendált *P. acnes* kolónia 1 µl-e)

A PCR program lépései:

1. elődenaturáció: 94 °C 1 perc
2. denaturáció: 94 °C 30 mp
3. annealing: 66 °C, 30 mp
4. polimerizáció: 72 °C, 1 perc
5. 2-4 lépések megismétlése 14 alkalommal
6. denaturáció: 94 °C 30 mp
7. annealing: 62 °C, 30 mp
8. polimerizáció: 72 °C, 1 perc
9. 6-8 lépések megismétlése 11 alkalommal
10. utópolimerizáció: 72 °C, 10 perc.

A mintákat 4 °C-on tároltuk felhasználásukig, majd a továbbiakban 50 bp-os DNS molekulasúly létra mellett 1% agaróz gélen választottuk el állandó (100 V) áramerősséggel.

2. táblázat. A Multiplex PCR reakció során felhasznált primerek végkoncentrációi

Primerek	Végkoncentráció
PArA-1 PArA-2	0,2 μ M
PAABC-1 PAABC-2	0,25 μ M
PASo-3 PASo-4	0,6 μ M
PAHvp-1 PAHvp-2	0,1 μ M
PAAAt-1 PAAAt-2	0,15 μ M
PARcA-1 PARcA-2	0,25 μ M

eMLST (expanded Multilocus Sequence Typing)

Laboratóriumunk teljes genom szekvenálásából nyert adatai lehetőséget biztosítottak számunkra, hogy kiválasszuk azokat a géneket, amelyek segítségével kifejleszthettük a tipizálási sémát. Hat háztartási gén részleges és 2 gén teljes szekvenciáját használtuk fel az eMLST kidolgozásához (a gének és a primerek listáját lásd 4.1.3). A PCR reakció után az amplikonokat 1%-os gélen megfuttattuk, kivágtuk, oszlopos módszert felhasználva kitisztítottuk (Geneaid) végül a szekvenciát kapilláris elektroforézis (3500 Series Genetic Analyzer, Life Technologies) módszerrel meghatároztuk. A kinyert szekvenciákat Genomic Workbench (CLC Bio) szoftverrel illesztettük, majd hasonlítottuk össze a referencia adatainkkal. Az MLST adatbázisba (<http://pubmlst.org/pacnes/>) történő feltöltés után meghatároztuk az izolátumok szekvencia típusait (Sequence Type; ST).

Reakcióelegy (15 μ l végtérfogat):

- 3 μ l 5x puffer
- 1,5 μ l 2,5 mM dNTP mix
- 1,5 μ l 25 mM MgCl₂
- 1 μ l templát gDNS (50 ng/ μ l)
- 0,1875 μ l Go Taq polimeráz (Promega)
- 1,875 μ l 10 pM primer

A PCR program lépései:

1. elődenaturáció: 95 °C, 3 perc

2. denaturáció: 95 °C, 30 mp
3. annealing: 56-58 °C, 15 mp
4. 3 lépés ismétlése 30 alkalommal
5. polimerizáció: 72 °C, 1 perc 10 mp
6. utópolimerizáció: 72 °C, 7 perc.

eBURST (eBased Upon Related Sequence Types)

Az eMLST analízis során kapott allél profil analízisre az eBURST v3 algoritmust használtuk fel. A populáció diverzitásának a vizsgálatokor először az alapító genotípusokat majd az al-alapító genotípusokat határoztuk meg. Az alapító genotípus meghatározásához az eST-okat klonális komplexekbe soroltuk azzal a kritériummal, hogy a komplex tagjai nem több mint 1 lókuszból térhetnek el, tehát a legtöbb közös alléllal rendelkezzenek. A klonális komplexek alapító genotípusát az az eST alkotja, melynek 1 lókuszos variánsa a legnagyobb, tehát a legnagyobb mértékben különbözik az összes többi eST-től a komplexben. Így az eBURST alkalmazásával olyan csoportok leszármazási útvonalát követjük nyomon, melyek izolátumai nagyon hasonlóak, szemben egy filogenetikai fával ahol az izolátumok genotípusának a hasonlóságáról kapunk információt.

MALDI-TOF MS

(matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry) Mátrix által közvetített lézerdesorpció ionizáció, repülésidő analízátorral ellátott tömegspektrometria

300 µl desztillált vízben az egy kolóniára szélesztett *P. acnes* izolátumokból szuszpenziót készítettünk, majd 900 µl 96% (v/v)-os etanolt adtunk hozzá. Az így fixált sejteket 10000 rpm-en 2 percig lecentrifugáltuk, a felülúszót eltávolítottuk majd szobahőmérsékleten beszárítottuk. Ezután 50 ml 70%-os vizes hangyasavban és 50 ml acetonitrilben visszaoldottuk a sejteket. Újabb centrifugálás (10 000 rpm 2 perc) után a felső fázisból 1 ml-t a speciális MALDI lemezre csöppentettünk. Újabb szobahőmérsékleten történő szárítás után 1 ml MALDI mátrixot (10 mg/ml-es α-ciano-4-hidroxi-fahéjsav 50%-os acetonitril/2.5% trifluoro-ecetsavban oldva) adtunk hozzá (Nagy, Maier és mtsa. 2009). A tömegspektrometriai mérésekhez Microflex LT MALDI-TOF készüléket használtunk (Bruker Daltonik, Bremen, Germany). A spektrumok felvétele lineáris, pozitív ionmódban 60 Hz frekvencián történt. Mérettartományt 2000-20,000Da

közé állítottuk be, és mintánként 20< spektrum felvétel készült. A mérési adatok kinyeréséhez MALDI Biotyper 3.2.1.1. szoftvert és adatbázist (Bruker Daltonik, Bremen, Germany) használtunk. Az izolátumok azonosítását a gyártó szerinti beállítások szerint hajtottuk végre.

3.2.5 Vékonyréteg kromatográfia

Mintaelőkészítés. A különböző filogenetikai csoportba tartozó baktériumokból 50 ml-es baktériumtenyészetet készítettünk. Lipáz aktivitásuk méréséhez 2% olívaolajjal egészítettük ki a baktérium kultúrákat. A továbbiakban a tenyészeteket addig növesztettük anaerob körülmények között, míg el nem érték az exponenciális (OD_{600} : 0,5) fázist. Ezután a sejteket kiülepítettük (4500 rpm, 10 perc) és a felülúszót leszűrtük (Millipore). A fehérje koagulációjához a felülúszót ammónium-szulfáttal (Sigma) kezeltük. 85%-os ammónium szulfát telítettség elérése után 4 °C-on egy éjszakán át inkubáltuk az extraktumot, majd 4500 rpm-en 20 percig lecentrifugáltuk. A felesleges ammónium-szulfátot, aceton:víz (4:1) keverékével távolítottuk el. Az így keletkezett fehérjekivonatot 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) oldatban oldottuk vissza. Az esetleges szabad zsírsavakat a mintákból háromszori n-hexános (Sigma) mosással távolítottuk el. A fehérje koncentráció meghatározása Qubit fluoriméterrel (Life Technologies) történt.

Vékonyréteg kromatográfia. 100 µg fehérje extraktumot minden izolátumból 3 és 24 óráig 300 rpm-en folyamatosan rázattunk a reakcióeleggyel (20 mM Tris-HCl (pH 6.0), 5% triton-X 100 és 0.2% triolein (Sigma)) 37 °C-on. A reakció hidrogén-kloriddal való leállítás után a mintákat vákuumszáritóban beszárítottuk, majd toluolban (Sigma) feloldottuk. Ezután 5 µl-t a felső fázisból szilika gélre (Silica Kieselgel 60, Merck) felvittünk (Linomat 5, Camag) 3 mm sáv szélességben. Petrol-éter:dietil-éter:formát (80:30:1) futtató elegyben (Saxena, ISAR és mtsa. 2005) választottuk szét a hidrolízis végtermékeit. Futtatás után a szilika gél szobahőmérsékleten megszáritottuk, majd az előhívó folyadékkal (10% réz-szulfát, 8% foszfor-sav) lefűjtük. Levegőn való szárítás után 100 °C-os szárítószekrénybe helyeztük a gél 10 percre. Minden törzsből 3 biológia és 2< technikai párhuzamos készült. Pozitív kontrollként (89 g/ml (w/v)) analitikai standard olajsavat (Sigma) használtunk 10^{-1} – 10^{-7} hígításban. Negatív kontroll minden mintából 30 perces hőinaktiválással készült.

Lipáz aktivitás meghatározása. A minták olajsav tartalmát a bomlástermékek denzitásának és felbontásának függvényében CP-Atlas szoftver (lazasoftware.com) segítségével határoztuk meg. A pozitív kontrollként használt olajsav adataiból meghatároztunk egy kalibrációs egyenest. Az így kapott egyenes egyenletét felhasználva pedig megállapítottunk a triolein hidrolízisének egy egységet (unit). A minták fehérje koncentrációjának a meghatározása után a leghígabb mintához viszonyítva így egy unit az a lipáz mennyiség, ami 350 ng olajsavat szabadít fel egy óra alatt.

Az anyagmennyiség meghatározása a standard egyenes egyenletének felhasználásával történt:

$$x = \left(\frac{(a - b) \pm c}{m} \right) * 30$$

Ahol **a**: a mért olajsav denzitása **b**: a minta háttéré; **c**: eltolódás az x-tengelyhez képest; **m**: az egyenes meredeksége. Végül az egyenletet megszoroztuk harminccal, ugyanis a mintáknak csak a harmincad részét vittük fel a szilika gélre.

Unit meghatározása

$$U = \frac{x}{350} * 3/24$$

Ahol az **x** a meghatározott anyagmennyiség osztva 350-el és megszorozva hárommal a 3 órás inkubáció és huszonnégyel a 24 órás inkubáció során.

3.2.6 A PRP-38 törzs mutagenézise

Az általunk kiválasztott PRP-38-as (IC típus) aknéből izolált törzsünkön deléciós mutagenézist hajtottunk végre kettős homológ rekombináció segítségével. A homológ rekombináció alapját szolgáló deléciós kazetta elemeit fúziós PCR segítségével 2 lépésben állítottuk össze. Az első PCR reakcióban előállítottuk a kazetta A és C elemét (lásd 4.8 fejezetben; 23. ábra). A két komponens a deletálni kívánt géntől upstream illetve downstream elhelyezkedő 500-500 bp hosszúságú régió. A felamplifikált régiókat a PCR reakció során az el nem használt primerektől megtisztítottuk (PCR fragment izoláló kit, Geneaid), majd egy következő PCR reakcióban az A komponens forward és C komponens reverse primereivel templátként használtuk fel őket. Az előállításukhoz felhasznált primerekre (A reverz, C forward) ráépítettük egymás 20 komplementer nukleotidját a

könnyebb felszaporítás érdekében. A komponensekből bemérendő mennyiségeket előzetes NanoDrop (Thermo Scientific) koncentráció meghatározás alapján állapítottuk meg. A PCR reakciók során a hiba nélküli átírás végett proof reading polimerázt (Finnzymes) alkalmaztunk. Az így kapott AC komponenst SmaI-restrikciós enzimmel (Sigma) emésztett pk19 vektorba ligáltuk be (T4 DNS ligáz, Fermentas). A ligálást követően *Escherichia coli* DH5a kompetens sejtbe transzformáltuk a ligátumot. A kanamicin rezisztens (50 µg/ml) pozitív klónokon univerzális plazmid primerekkel (univ, opseq) kolónia PCR-t végeztünk, és az így kapott fragmenteket oszlopon tisztítottuk (Geneaid), kapilláris elektroforézissel (3500 Series Genetic Analyzer, Life Technologies) meghatározott, megfelelő pozíciójú inszertet tartalmazó klónokat kiválasztottuk. Az így szelektál klónokból plazmidot tisztítottunk (Sambrook és William 2001) majd a vad típusú PRP-38-as törzsbe protoplaszt képzéssel (10 mg/ml lizozim (Sigma) 37 °C, 30 perc) 100 ng plazmidot transzformáltunk és kanamicines véres-agarra szélesztettük. Egy hét anaerob inkubáció után a megjelenő telepeken kolónia PCR-el (KmR forward és KmR reverse) leellenőriztük a plazmid meglétét. A pozitív klónokból egyet kiválasztottunk és kanamicines BHI folyadékba leoltottuk. A felnövesztett tenyészetből 96-os sejttenyésztő lemezben replikát készítettünk. Az így előállított replikátumot újabb 10 alkalommal átreplicáztuk kanamicin és kanamicin nélküli táptalajára, ahol minden alkalommal a vad típusú PRP-38-as törzset használtuk kontrollként. A kanamicint nem tartalmazó táptalajon növekedő, de az antibiotikumot tartalmazó táptalajon nem növekedő telepet kiválasztottuk és a deléciós kazettától up- és downstream elhelyezkedő ellenőrző primerpárral PCR reakciót hajtottunk végre. Az így előállított mutáns törzs - továbbiakban PRP-38/D4 - replikátumait -80 °C-on BHI tápoldatban tároltuk felhasználásukig, amely 12% (v/v) glicerolt tartalmazott.

3.2.7 Fluorometriás lipáz aktivitás meghatározása

Mintaelőkészítés. A vizsgált törzseket 50 ml BHI tápfolyadékba leoltottuk majd anaerob körülmények között növesztettük az exponenciális fázisuk eléréséig. A sejtek kiülepítése után a felülúszót leszűrtük (Millipore), ezután 10K NMWL Amicon csövekben 2 ml-re bekoncentráltuk a gyártó leírása szerint (Millipore). A minták szabad zsírsav tartalmától háromszori n-hexános mosás révén szabadultunk meg, fehérje tartalmuk meghatározása pedig Qubit fluoriméter segítségével történt a gyártó ajánlása szerint (Life Technologies). Azért, hogy a pontos szubsztrát-specifikus hidrolitikus aktivitását

vizsgáljuk a különböző törzseknek 4-metilumbelliferil-oleát (4-MU-O, Sigma) fluorogénikus szubsztrátot használtunk a gyártó leírása szerint (λ_{ex} :327nm; λ_{em} 449nm, 0.1 M Foszfátbuffer, pH 7.0 és 37 °C) a fluorometriás kísérleteink során. A mintákat 3 órán át inkubáltuk a szubsztráttal, majd végpont analízist végeztünk (Jacks és Kircher 1967) (FLUOStar Optima). A kalibrációhoz 4-metilumbelliferil (4-MU) (Sigma) standardot használtunk 15 $\mu\text{m}/\text{ml}$ koncentrációban és 10^{-1} - 10^{-6} hígításban. A kalibrációs egyenes egyenletét felhasználva, ugyanazon az elven, mint a TLC-s kísérletben (lásd feljebb) meghatároztuk a minták 4-MU/mg fehérjetartalmát.

3.2.8 Pásztázó elektronmikroszkóp

A kiválasztott törzseket BHI tápoldatban, exponenciális fázisig történő növesztés után kiülepítettük (3000rpm, 10perc), desztillált vízben háromszor mostuk, majd a térfogatot 100 μl -re beállítottuk. Ezt követően fedőlemezre cseppentettük a szuszpenziót, szobahőmérsékleten beszárítottuk, és 24 órán át 4 °C-on fixáltuk a sejteket (2.5% (v/v) glutáraldehid, 0.05 M kakodilát pufferben (pH 7,5) (Sabatini, Bensch és mtsa. 1963)). Következő napon a mintákat jégen tartva etanollal dehidratáltuk (50%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% és 100% v/v) ezután az abszolút alkoholt (100% EtOH) lecseréltük terc-butanolra (terc-butanol: 100% EtOH=1:2, 1:1 és 2:1 arányban). 24 órás terc-butanos inkubálást követően a mintákat liofilizáltuk 3 órán át majd az arany bevonat elkészítése után HITACHI S-4700 berendezésen elektronmikroszkópos felvételeket készítettünk.

3.2.9 Áramlásos citometria

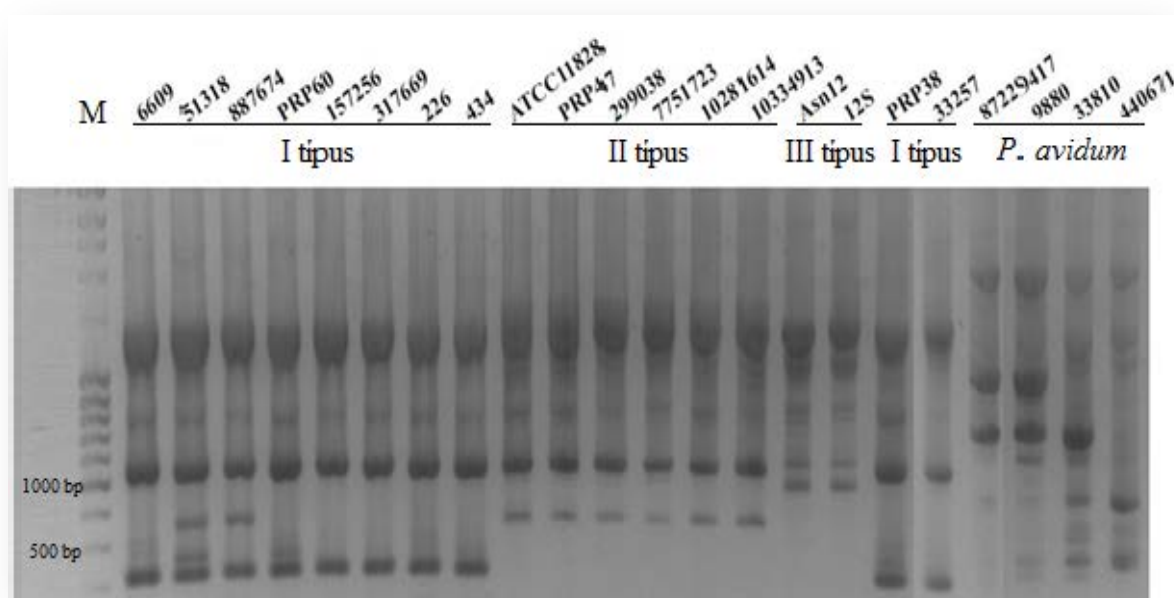
A kiválasztott baktérium törzsek tenyésztése után (OD_{600} : 0,5) a sejteket lecentrifugáltuk (300 rpm, 10perc), foszfát pufferben (PBS, Gibco) mostuk kétszer, és 24 órán át 70%-os (v/v) etanolban fixáltuk. Újabb PBS-es mosást követően a sejtek aggregációjának megszüntetése érdekében szonikáltuk a sejteket (1,5 perc 0,5 másoperces ciklusokban 75%-os amplitúdóval), majd 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ koncentrációjú propidium-jodiddal (λ_{ex} 540 nm; λ_{em} 608 nm, Sigma) megfestettük. A sejtek DNS tartalmát és méretét BD FACS Jazz (BD Biosciences) áramlásos citométerrel vizsgáltuk. Kontrollként jelöletlen sejteket és üres PBS puffert használtunk.

4. EREDMÉNYEK

4.1 *Propionibacterium acnes* azonsítási és osztályozási módszerek kifejlesztése

4.1.1 A törzsgyűjtemény jellemzése RAPD alkalmazásával

A *Propionibacterium acnes* baktériumot egyre több klinikai kórkép során azonosítják, így a pontos jellemzése mára már nélkülözhetetlen a mikrobiológiai diagnosztika számára. Annak érdekében, hogy a továbbiakban meg tudjuk állapítani az általunk kifejlesztett azonsítási és osztályozási módszerek megbízhatóságát, a rendelkezésünkre álló törzsek DNS polimorfizmusát a Perry és munkatársai által leírt RAPD módszerrel követtük nyomon (Perry, Worthington és mtsa. 2003). Ennél a módszernél a reprodukálhatóság érdekében elengedhetetlen a megfelelő reakció körülmény és a DNS templát mennyiségének helyes megválasztása, a jelen dolgozatban egyetlen reprezentatív kísérlet eredménye kerül bemutatásra (9. ábra). Előzőleg a telepmorfológia alapján a *Propionibacterium*-ok közé sorolt, 22 klinikai mintából a RAPD módszerrel 18 izolátumot azonosítottunk, mint *P. acnes*. Annak ellenére, hogy a telepek morfológiája teljesen megegyezett a *P. acnes*-el, a fennmaradó 4 törzs teljesen más RAPD amplikon mintázatot mutatott (87229417; 9880; 33810; 440671) - többek között hiányzik a *P. acnes*-re jellemző 1400 bp méretű amplikon. A 16S rDNS kapilláris elektroforézises szekvenálásával végül megállapítottuk, hogy ezek *P. avidum* izolátumok. A RAPD módszer alacsony felbontását jól mutatja, hogy a PRP-38 és a 33257 törzsek amplikon mintázata leginkább az I-es típusba tartozó törzsekhez hasonlít, ennek ellenére mégsem tudtuk őket teljes biztonsággal besorolni. Következésképpen a RAPD módszert felhasználva a *P. acnes* törzseket 3 fő típusba lehet sorolni: nevezetesen az I-es, a II-es és a III-as típusba.



9. ábra. 22 *Propionibacterium* izolátum RAPD analízise. 18 *P. acnes* és 4 *P. avidum* izolátum RAPD amplikon mintázata. A RAPD képes a *P. acnes* izolátumokat a 3 fő típusba sorolni, azonban egyes törzsek amplikon mintázata (pl. 6609, PRP38, 33257) nem elég konkluzív ahhoz, hogy az I-es típuson belül tovább csoportosítsa a törzseket. M: 1 kb marker.

4.1.2 Multiplex PCR

Az előzőekben láthattuk, hogy a RAPD módszer felbontása nem elegendő ahhoz, hogy a fő típusokon belül különbséget tegyünk. Minthogy munkacsoportunk elsőként mutatta be azt, hogy különböző *P. acnes* izolátum eltérő immunválaszt indukál keratinocitákban, így fontos a kolonizáló törzs pontos azonosítása. Laboratóriumunk a rendelkezésére álló >30 *P. acnes* izolátum teljes genomszekvenciájának felhasználásával a belfasti Egyetem Immunológiai Intézetével közösen olyan módszert dolgozott ki, amely a genomokban meglévő különbségekre építve képes meghatározni az adott *P. acnes* izolátum pontos filogenetikai típusát. A módszer, amely egy klasszikus touchdown multiplex PCR (MPCR), 6 primerpár segítségével egyetlen reakcióban képes rendkívül megbízhatóan besorolni - a jelenleg ismert 6 fő filogenetikai típusba - a klinikai izolátumokat. A primerek tervezése során olyan régiókat választottunk, amelyek kizárólag egyes filogenetikai csoportban vannak jelen, vagy a filogenetikai csoportra jellemző specifikus polimorfizmus található a régióban. A kritériumoknak megfelelő régiókra olyan primerpárokat terveztünk, melyek olvadási hőmérséklete megegyezik, így egyetlen PCR reakcióban alkalmazhatóak. Az izolátumok azonosítása a PCR során keletkező eltérő méretű amplikonokon alapszik. Filogenetikai csoport-specifikus polimorfizmusokat

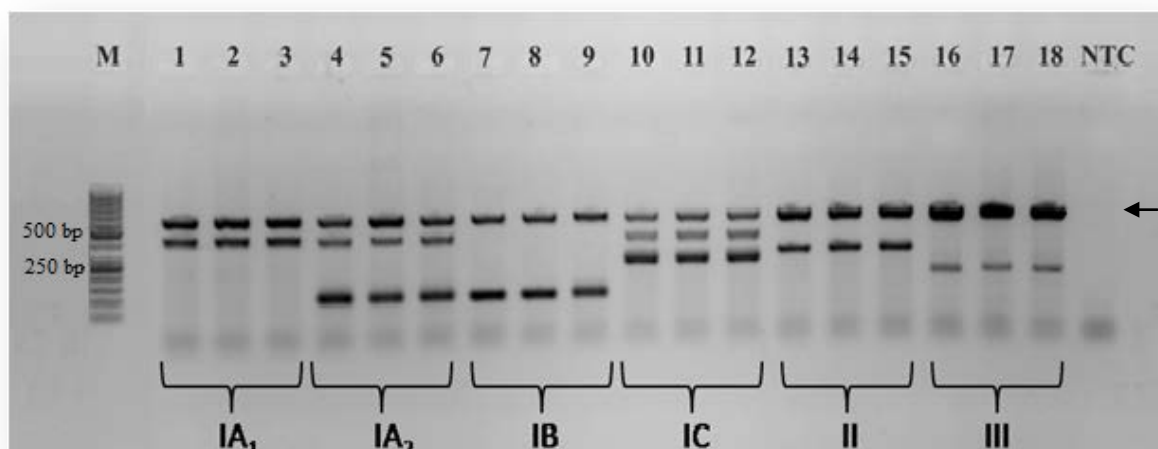
azonosítottunk a *sodA*, a *recA* és az *atpD* génekben így a MPCR-ben a *sodA* gén primerpárja specifikusan csak az IA₂ és IB típust targetálja míg az *atpD* és a *recA* gének primerpárjai a II-es és III-as típust targetálják. Teljes genom szekvenálási adatokat felhasználva megállapítottuk, hogy az ABC típusú peptid felvevő operon ATP-kötő doménje (ATP-szintáz; génbank azonosító: DQ208967.1) csak az IA₁, az IA₂ és az IC típusban van jelen, és hiányzik az IB, a II-es és a III-as típusból. Továbbá az IC típusú törzsekben egy hipotetikus virulencia gént (hvp) (Fic család; génbank azonosító: TICEST70_07737) azonosítottunk, mely hiányzik az összes többi típusból, így a primerpár ezt a régiót célozza meg. Kísérleteink során a *P. acnes* specifikus 16S rDNS primerpárt úgy terveztük, hogy kizárólag a *P. acnes* rDNS-éhez kötődve képes amplifikálni az adott szakaszt, így megbizonyosodhatunk arról, hogy az adott izolátum valóban *P. acnes*. A 4. táblázat összesítve mutatja a primerek specificitását, valamint a target régiókat és az amplikonok méretét.

Primer	Specificitás	Target régió	Amplikon (bp)
PArA-1 PArA-2	<i>P. acnes</i>	16S rDNS	677
PAABC-1 PAABC-2	Filotípus IA _{1/2}	ABC transzporter	494
PASo-3 PASo-4	Filotípus IA ₂ és IB	<i>sodA</i>	145
PAHvp-1 PAHvp-2	Filotípus IC	Hipotetikus virulencia gén (hvp)	305
PAAAt-1 PAAAt-2	Filotípus II	<i>atpD</i>	351
PARcA-1 PARcA-2	Filotípus III	<i>recA</i>	225

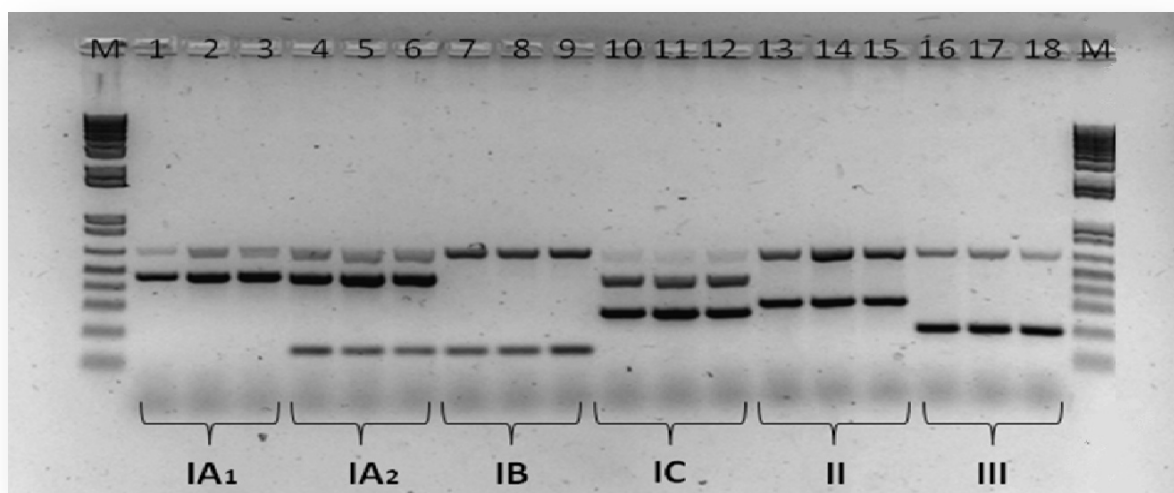
3. táblázat. A multplex PCR során felhasznált primerek és gének jellemzői.

A hexaplex PCR minden primerpárját leteszteltük az összes filogenetikai típusra, aspecifikus amplikont nem azonosítottunk. Annak érdekében, hogy megbizonyosodjunk a specificitásról, minden egyes amplikont kapilláris szekvenáló módszerrel ellenőriztünk. A hexaplex MPCR stratégiát felhasználva a különböző filogenetikai típus-specifikus amplikonok alapján az izolátumok immáron a 6 fő filogenetikai csoportba sorolhatóak (IA₁, IA₂, IB, IC, II, III) (10. ábra). Annak érdekében, hogy tovább gyorsítsuk a frissen

izolált klinikai törzsek tipizálását, tovább optimalizáltuk a MPCR-t, így immáron genomi DNS tisztítás nélkül kolónia PCR-ben is működik a reakció (11 ábra).



10. ábra. Genomi DNS felhasználásával a multiplex PCR során létrehozott ampliconok specifikusan jelölik az egyes *P. acnes* filogenetikai típusokat. A 677 bp-os amplicon specifikusan a *P. acnes* 16S rDNS ampliconja. Az 1-3 oszlopban az IA₁ (1: hdn-1, 2: PRP-60, 3: M7), a 4-6 oszlopban az IA₂ (4: P.acn33, 5: P.acn17, 6: P.acn31), a 7-9 oszlopban az IB (7: 4/4/7, 8: VA3/4, 9: M3), a 10-12 oszlopban az IC (10: PRP-38, 11: PV66, 12: 5/1/3), a 13-15 oszlopban a II (13: ATCC11828, VA2/9 N, 15: M20) és a 16-18 oszlopban a III (16: 12S, 17: Asn12, 18: Asn10) típusba tartozó törzsek specifikus amplicon-mintázata látható; M: 100 bp marker.

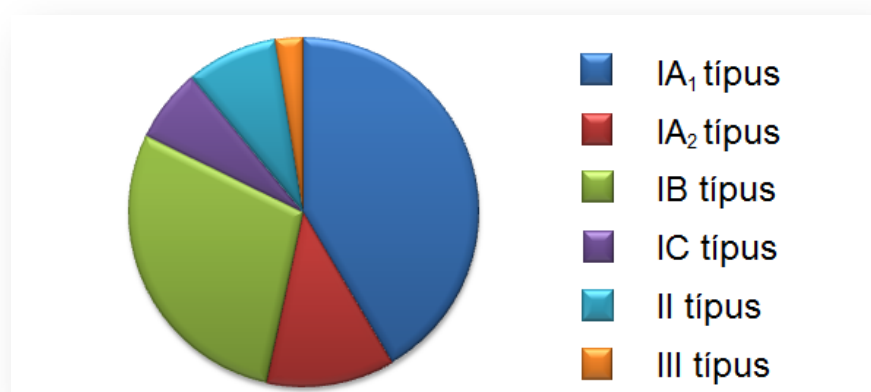


11. ábra. Kolónia multiplex PCR. A 677 bp amplicon specifikusan a *P. acnes* 16S rDNS ampliconja. Az 1-3 oszlopban az IA₁ (1: L1958, 2: W633, 3: PV40), a 4-6 oszlopban az IA₂ (4: 1A, 5: 10S, 6: 12C), a 7-9 oszlopban az IB (7: Asn40, 8: Asn55, 9: Asn86), a 10-12 oszlopban az IC (10: PRP-38, 11: 5/1/3, 12: 5/1/5), a 13-15 oszlopban a II (13: SG2, 14: ATB1, 15: ET1) és a 16-18 oszlopban a III (16: 12S, 17: 17S, 18: 20C) típusba tartozó törzsek specifikus amplicon-mintázata látható; M: 100 bp marker.

Mindkét ábra (10. és 11. ábra) 1-18-ig számozva különböző *P. acnes* izolátumok multiplex PCR utáni amplicon mintázatát mutatja be: a 677 bp-nál található amplicon

specifikusan a *P. acnes* 16S rDNS-ének egy adott szakasza: ez az ábrákon minden izolátumnál detektálható. Az 1-3 oszlopokban az IA₁ típusú törzsek jellegzetes amplikon mintázata látható: ebben az esetben az 5 primerpár kizárólag a ABC transzporter 494 bp-os szakaszát képes amplifikálni. A 4-6 oszlopokban az IA₂ típusú izolátumok találhatóak meg, amelyekben az ABC transzporter mellett a *sodA* 145 bp-os szakasza is amplifikálódik. A 7-9 számozású oszlopokban IB típusú izolátumoknál a 16S rDNS mellett a *sodA* 145 bp méretű amplikonja jelenik meg. A 10-12 oszlopokban az IC típusú izolátumok amplikon mintázatát az ABC transzporter 494 bp-os valamint a hipotetikus virulencia gén (hvp) 305 bp-os amplikonjai határozzák meg. A 13-15 oszlopokban a II típusú *P. acnes* törzsek láthatóak az amplifikálódott *atpD* 351 bp-os target szakasszal. Végül a 16-18 oszlopokban a III-as típusú izolátumok mintázatát a *recA* gén 225 bp-os amplikonja jellemzi. Megállapítható tehát, hogy a MPCR alkalmazásával kiküszöbölhető a RAPD tipizálás összes hátránya, vagyis az általunk kidolgozott módszer gyors, reprodukálható és a jelenleg ismert típusokat egyetlen reakcióban nagy megbízhatósággal azonosítja (11. ábra).

A multiplex PCR alkalmazása során így rendkívül gyorsan megbízható eredményt kapunk az újonnan azonosított *P. acnes* izolátumokról, melynek így felbontása és specificitása széleskörű. Ezt kihasználva a rendelkezésünkre álló törzseken (>150) elvégeztük a MPCR analízist, amely során megállapítottuk hogy a klinikai izolátumaink legnagyobb részt az IA₁ és IB filogenetikai típusba sorolhatóak. Ez egybehangzik a filogenetikai analízis eredményeivel (eBURST), miszerint IA₁ filogenetikai csoportba főként az acne vulgarisból származó izolátumok sorolhatóak, míg az IB csoportba a egészséges bőrfelületről izolált törzsek tartoznak (12. ábra) (McDowell, Barnard és mtsa. 2012).



12. ábra. A törzsgyűjtemény multiplex PCR-el történő analízise. Legnagyobb számban az IA₁ és az IB filogenetikai típus fordul elő, míg a legkevesebb izolátumot a III-as típusból azonosítottunk. n>150.

4.1.3 eMLST

Munkacsoportunk részt vett a 7 háztartási gén részleges szekvenciájának alkalmazásával kialakított MLST kidolgozásában, amellyel 4 filogenetikai csoportba (IA, IB, II és III) tudtuk sorolni a törzseket (McDowell, Gao és mtsa. 2011). A rendelkezésünkre álló teljes genomok adatait felhasználva azonban a felbontás további növelése érdekében - pl. IC típus MLST azonosítása - finomítottuk a módszert. Az egy lókuszos *recA* alapú filogenetikai csoportosítás során, a *recA* génben lévő polimorfizmus a *recA* gén 897. pozíciójában egy G>A polimorfizmus azonosításával az I-es csoportban elkülöníthető az IA és IB típus (Sampedro, Piper és mtsa. 2009; Niazi, Clarke és mtsa. 2010). Azonban az MLST analízis során a 7 háztartási gén alkalmazásával, esetenként az IA típusban is detektáltuk azt az allél variációt, ami a csoportosítás alapját képezi. Annak érdekében, hogy ne okozzon nehézséget az IA és az IB csoport elkülönítése, a *recA* lókuszt eltávolítottuk. A lókuszt eltávolítása nem okozott változást az izolátumok szekvencia típusokba sorolásakor és a filogenetikai analízis során. A módszer specifikusságának a növelése érdekében viszont további négy virulencia gént tanulmányoztunk (*camp2*, *gehA*, *pap60*, *tly*). A virulencia gének vizsgálata során, a *camp2* (Christie-Atkins-Munch-Petersen (CAMP) faktor homológ) és a *tly* (hemolizin) gének felhasználásával, az MLST módszerrel 71 izolátumból 30 szekvencia típust azonosítottunk. Az így átdolgozott 8 gén felhasználásával (*aroE*, *atpD*, *gmk*, *guaA*, *lepA*, *sodA*, *tly* és a *camp2*) készült eMLST (expanded MLST) 6 filogenetikai csoportra képes osztani az izolátumokat: IA₁, IA₂, IB, IC, II, és III (4. táblázat).

Gén	Fehérje	Amplikon mérete
<i>aroE</i>	Shikimate 5-dehidrogenáz	424 bp
<i>atpD</i>	ATP-szintáz	453 bp
<i>gmk</i>	Guanilát-kináz	400bp
<i>guaA</i>	GMP-szintáz	493bp
<i>lepA</i>	GTP-kötő fehérje	453bp
<i>sodA</i>	Szuperoxid-dizmutáz	450bp
<i>camp2</i>	Christie-Atkins-Munch-Petersen faktor	804bp
<i>tly</i>	Hemolizin	777bp

4. táblázat. Az eMLST kidolgozásához használt gének jellemzői. A PCR reakció után egyenként izoláljuk és megszekvenáljuk az amplikonokat, majd az MLST adatbázisba való feltöltés után meghatározzuk a szekvencia típusokat.

Az eMLST során meghatározott 8 gén szekvenciájának az allél kombinációjával megállapítható az e-szekvencia típus (eST). Ily módon az előzőleg multiplex PCR módszerrel tipizált izolátumainkról még pontosabb képet kaphatunk a filogenetikai csoportjukon belüli hovatarozásukról. A 5. táblázat foglalja össze a kiválasztott izolátumok RAPD, MLST, MPCR és eMLST adatait.

Izolátum	RAPD profil	Szekvencia típus - MLST	MLST filotípus	MPCR	Szekvencia típus - eMLST	eMLST filotípus
PRP-60	I	ST-6	IA	IA ₁	eST-20	IA ₁
157256	I	ST-6	IA	IA ₁	eST-3	IA ₁
317669	I	ST-6	IA	IA ₁	eST-1	IA ₁
226	I	ST-6	IA	IA ₁	eST-31	IA ₁
434	I	ST-25	IA	IA ₁	eST-20	IA ₁
P.acn31	I	ST-27	IA	IA ₂	eST-36	IA ₂
P.acn33	I	ST-9	IA	IA ₂	eST-2	IA ₂
P.acn17	I	ST-22	IA	IA ₂	eST-22	IA ₂
6609	I	ST-10	IB	IB	eST-5	IB
51318	I	ST-10	IB	IB	eST-5	IB
887674	I	ST-10	IB	IB	eST-5	IB
PRP-38	I	ST-29	IA	IC	eST-70	IC
ATCC11828	II	ST-44	II	II	eST-27	II
PRP-47	II	ST-40	II	II	eST-28	II
Asn12	III	ST-19	III	III	eST-33	III
12S	III	ST-30	III	III	eST-81	III

5. táblázat. Összesítő táblázat az egyes izolátumok RAPD, MLST, MPCR és eMLST adataival. A négy módszer közül az eMLST felbontása a legjobb, amely segítségével immáron >110 allélkombinációt (eST-t) sikerült azonosítanunk.

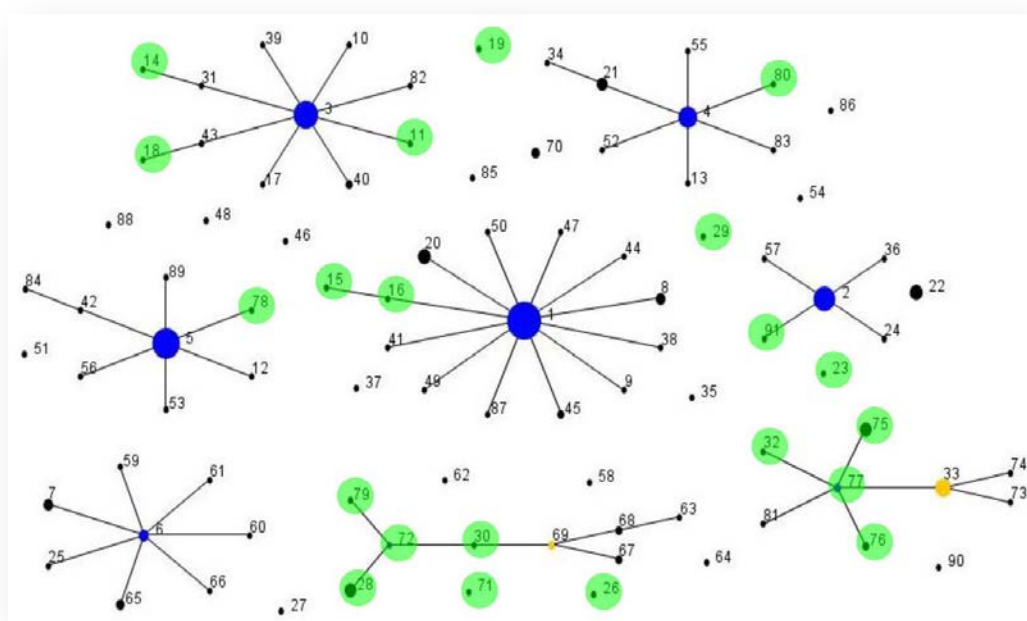
Az általunk kialakított eMLST módszer tehát 6 háztartási gén részleges és 2 feltételezett virulencia gén teljes nukleotid szekvencia analízisén alapul. Az eMLST az eredeti MLST-hez képest jelentősen megnövelt felbontást biztosít: immáron 6 filogenetikai csoportra képes osztani az izolátumokat, úgy mint IA₁, IA₂, IB, IC, II és III. További jelentősége az eMLST-nek, hogy a filogenetikai csoportok immáron a betegségeket is jól reprezentálják: az IA₁ és IC csoportba sorolt izolátumok elsősorban aknés bőrről származnak, az IA₂ izolátumokat aknéből és szemfertőzésekből izoláltuk, az IB, II és III csoportba tartozók pedig nagy valószínűséggel a kommenzalisták, és kisebb arányban orvosi implantátumokkal kapcsolatos fertőzésekkel hozhatók összefüggésbe (6. táblázat).

	IA ₁	IA ₂	IB	IC	II	III
Acne vulgaris	77 (64%)	9 (33%)	6 (24%)	4 (100%)	8 (25%)	0
Egészséges bőr	30 (25%)	14 (52%)	7 (28%)	0	12 (38%)	14 (88%)
Szemfertőzés	11 (9%)	4 (15%)	2 (8%)	0	1 (3%)	1 (6%)
Implantátum	2 (2%)	0	10 (40%)	0	11 (34%)	1 (6%)
Összes izolátum	120 (100%)	27 (100%)	25 (100%)	4 (100%)	32 (100%)	16 (100%)

6. táblázat. Az eMLST analízisben használt izolátumok százalékos eloszlása a különböző betegségek függvényében.

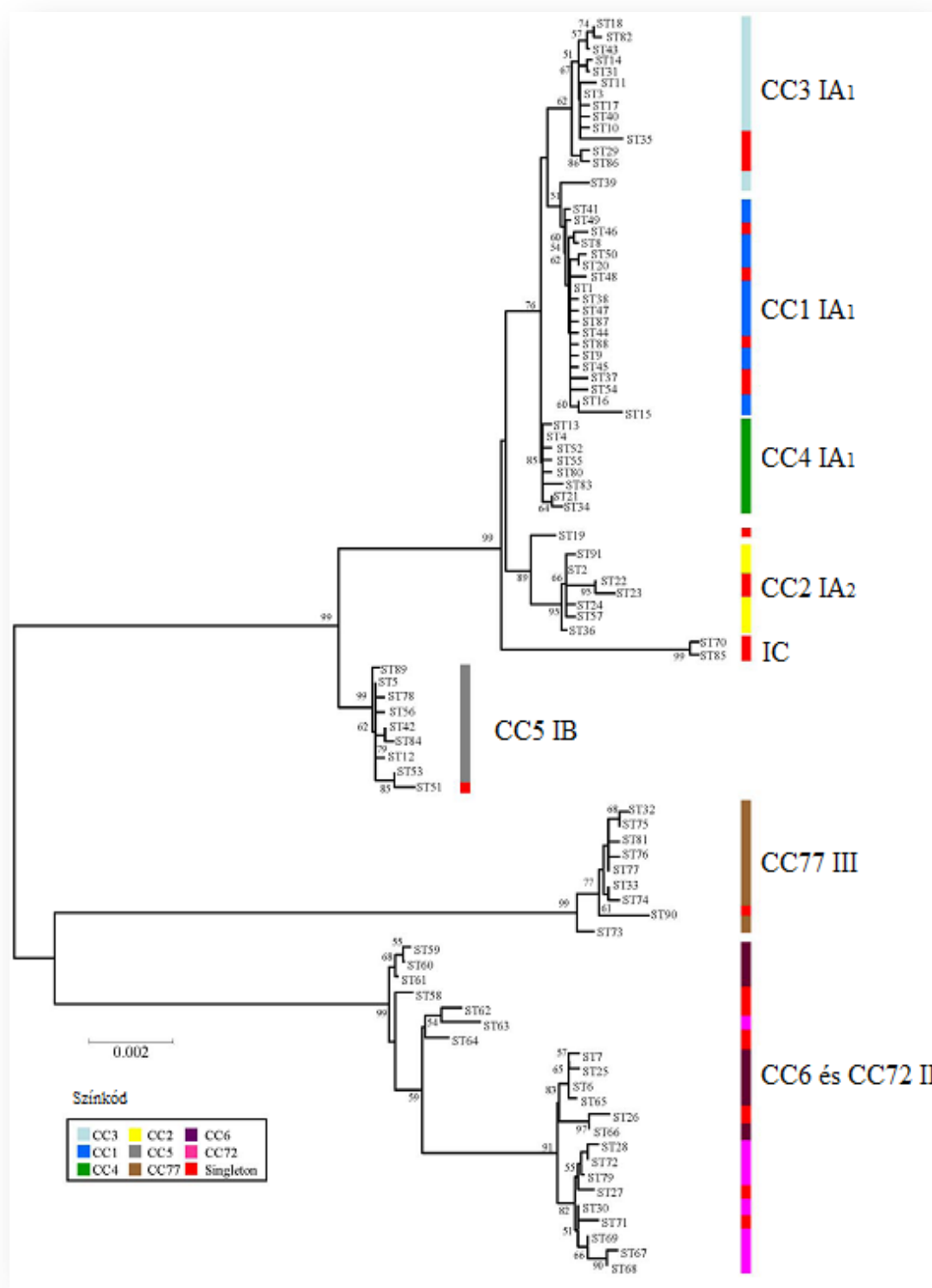
4.2 Filogenetika

Az eBURST algoritmus segítségével és az eMLST adatbázis felhasználásával 91 eST-t 8 klonális komplexbe (CC) soroltunk, továbbá 21 szingletont (olyan eST-k, amelyet jelenleg csak egyetlen izolátum jellemez) különítettünk el. Az egyes klonális komplexeken belül az eST-k legalább 7/8 közös alléllal rendelkeznek egy másik eST-vel. Az IA₁ izolátumokat a CC1, CC3 és CC4 klonális komplexek és 11 szingletont, az IA₂ izolátumokat a CC2 klonális komplex és 2 szingletont, az IB izolátumokat a CC5 klonális komplex és 1 szingletont, a II-es típusú izolátumokat a CC6, CC69 klonális komplexek és 6 szingletont, a III-as izolátumokat pedig a CC77 klonális komplex és 1 szingletont képviseli (13. ábra).



13. ábra. Az eMLST adatbázis eBURST analízise. Az egyes eST-k gyakoriságát a körök területe jelzi. Kék: alapító genotípusok, sárga: al-alapító genotípusok, zöld: egészséges bőrről izolált eST-k.

A nagy felbontású eMLST tipizálási módszer, továbbá az eBURST eredményei lehetővé tették számunkra, hogy az eST-k alapján fejlődéstörténeti analízist hajtsunk végre, amelynek eredményeként egy filogenetikai fát kaptunk (14. ábra).



14. ábra. 91 *P. acnes* eST-jéből összeillesztett génszekvenciák minimum evolúciós filogenetikai fája. A fa karjain a lefedettségi értékek láthatóak, a vízszintes vonalak hossza a genetikai távolságot jelzik, a függőleges színes sávok az eBURST alapján azonosított klonális komplexeket jelölik. A szinkódok és a hozzájuk tartozó eBURST csoportok, valamint a szingletonok a bekeretezett részben vannak részletezve.

Az izolátumok 3 fő kládba oszthatók fel a *tly* és *camp2* faktor génszekvenciák alapján, ami arra utal, hogy ezek a faktorok együtt fejlődtek a háztartási génekkel: ez a 3 klád a fő filotípusoknak (I, II és III) felel meg. Az I-es kládon belül az IA típusú törzsektől genetikai távolság szempontjából jól elkülönülő csoportot alkotnak az IB típusú eST-ket képviselő izolátumok. Az IA típusú izolátumokat 2 nagyon eltérő csoportba soroltuk melyek, az IA₁ és IA₂ típusoknak felelnek meg. Az IA₁ izolátumok 3 csoportba különíthetők el, amelyek a CC1, CC3 és CC4 klonális komplexeknek felelnek meg. Az I-es kládon belül továbbá az IC típusú izolátumokat is elkülönítettük, amelyek az eBURST felvételen még az IA₁ osztályon belül helyezkedtek el (14. ábra). Az aknés izolátumok jelentős része az IA₁ típus CC1, CC3 és CC4 klonális komplexeibe sorolható, és leggyakrabban az eST1 szekvencia típusba tartoznak. Azonban további klinikai állapotok esetén is izolálták ezt az e-szekvencia típust pl. fogászati és szemészeti gyulladások esetén, ami bizonyítékot nyújt arra, hogy a leágazás patogén profilja nem csak az aknéra korlátozódik. Az aknés izolátumokat kisebb arányban az eST3 és eST4 szekvencia típusok is képviselik. Az egészséges bőrről származó izolátumok nagy része az IB típus CC5, a II-es típus CC72 és III-as típus CC77 klonális komplexek tagjai, és kisebb hányadában orvosi implantátumokkal kapcsolatos fertőzésekkel is összefüggésbe hozhatók.

4.3 Teljes genom szekvenálások

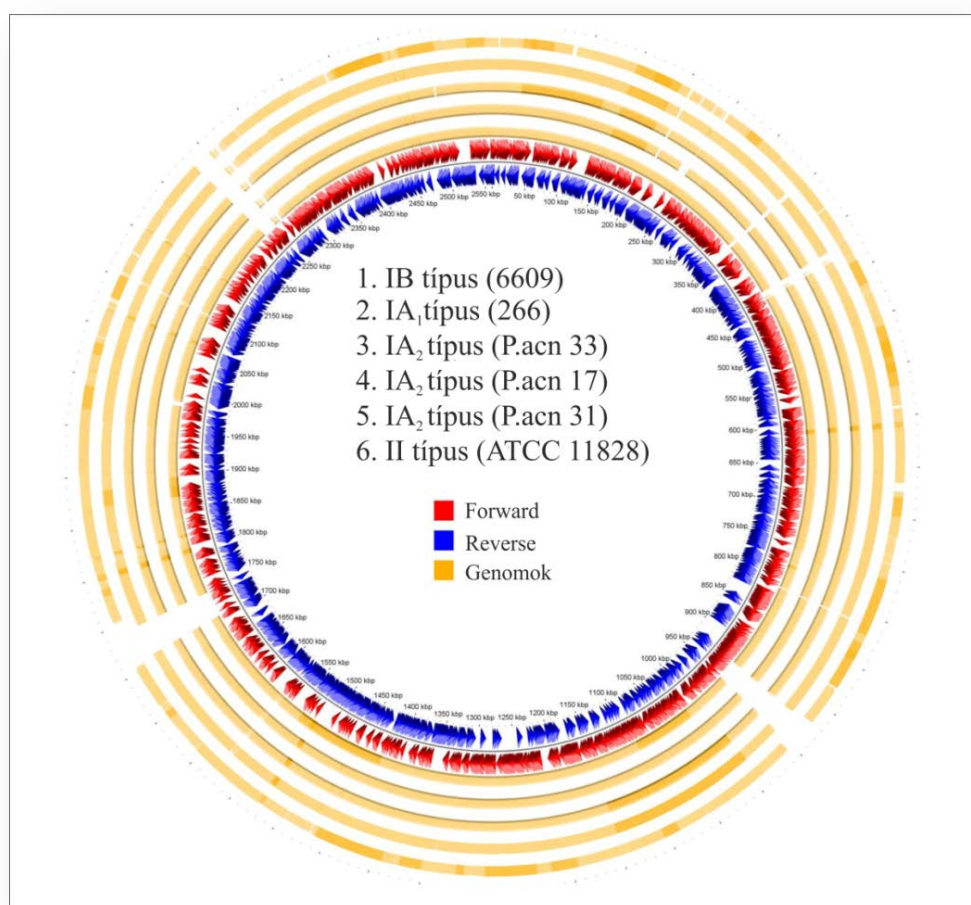
Az első *P. acnes* genom megszekvenálásával betekintést kaptunk a baktérium biológiai és biokémiai jellegzetességeibe. Azonosítottak számos olyan gént, amelyeknek feltehetőleg szerepe van a *P. acnes* kolonizációs képességében, továbbá a megváltozott környezeti feltételekhez való adaptálódásában (Bruggemann, Henne és mtsa. 2004). Munkacsoportunk 2004-ben elsőként írta le, hogy a különböző *P. acnes* izolátumok eltérő immunválaszt váltanak ki keratinocitákban (Nagy, Pivarcsi és mtsa. 2005). Annak érdekében, hogy jobban megismerjük a gazda-patogén kölcsönhatás molekuláris alapjait, nélkülözhetetlen a kolonizáló fajok genom ismerete, ezen felül a kommenzalista és a potenciálisan patogén törzsek elkülönítése. Ezért teljes genom szekvenálásaink során olyan törzseket választottunk ki, amelyekkel reprezentálni tudjuk a - feltételezhetően - patogén (IA₁; IA₂; IC) és kommenzalista (IB; II; III) filogenetikai csoportot (8. táblázat).

Törzs neve	Filotípus	Kromoszóma mérete	Kódoló szekvencia	Kontig szám	NCBI azonosító
hdn-1	IA ₁	2 494 562 bp	2 302	1	CP006032
P.acn17	IA ₂	2 489 626 bp	2 236	1	CP003196
P.acn31		2 522 885 bp	2 266	1	CP003197
P.acn33		2 498 766 bp	2 247	1	CP003195
6609	IB	2 560 282 bp	2 358	1	CP002815
PRP-38	IC	2 507 426 bp	2 233	12	AJJP00000000
ATCC11828	II	2 488 752 bp	2 260	1	CP003084
Asn12	III	2 581 243 bp	2 478	2	nem közölt

8. táblázat. Az általunk megszekvenált *P. acnes* teljes genomok jellemzői.

A genom szekvenálások során az összes megszekvenált törzsben 45 tDNS-t és 6 rDNS lókuszt azonosítottunk kivéve a PRP-38-as törzsnél ahol 9rDNS lókuszt azonosítottunk ~60%-os GC tartalommal.

A genomok egymáshoz viszonyításával számos különbséget azonosítottunk, többek között potenciális virulencia faktorokat, az antibiotikum rezisztenciáért valamint morfológiai változásért felelős géneket. Az előzőleg kommenzalistaként számoltartott 6609-es (Hunyadkurti, Feltoti és mtsa. 2011) az ATCC11828-as (Horvath, Hunyadkurti és mtsa. 2012) és az Asn12 törzsben, a dermatán-szulfát-kötő fehérje jelenlétét nem sikerült azonosítani, ami tovább hangsúlyozza azt a feltételezést, hogy kommenzalistaként vannak jelen a bőr felszínén. Továbbá a potenciális patogén, IC filogenetikai csoportba besorolt, antibiotikum-rezisztens PRP-38-as izolátum rDNS operonjában található mutáció felelős valószínűleg a rezisztenciáért ((MIC (minimális inhibitor koncentráció): tetraciklin: 0,32 µg/ml; eritromicin: ≥256 µg/ml; klindamicin: 0,38 µg/ml) (McDowell, Hunyadkurti és mtsa. 2012)). Az IC filogenetikai csoportba tartozó további izolátumokat megvizsgálva ugyanezt a jelenséget azonosítottuk, miszerint: a 16S rDNS kis alegységében egy transzverziós mutáció (purin bázis cseréje pirimidinre(1058G>C)) az ami a tetraciklin rezisztenciáért felelős (Ross, Eady és mtsa. 1998). Ezen felül a 23S rDNS V. doménjében tranzíciós mutáció (purin bázis cseréje purinra) ahol a 2059A>G az eritromicin és a klindamicin rezisztenciáért felelős.



15. ábra. Hat *Propionibacterium acnes* teljes genomjának összehasonlítása. A legbelső genomon a sense szálon lévő gének pirossal, késsel pedig az antisense szálon lévő gének vannak jelölve; ehhez a genomhoz van viszonyítva a többi 5 (sárgával jelölve). A sötét sárga nagyfokú konzerváltságot jelöl, a sárga körökben a fehér megszakítások jelölik a hiányzó kromoszóma-szakaszokat.

4.4 A III-as típusú filogenetikai csoport morfológiai jellemzése

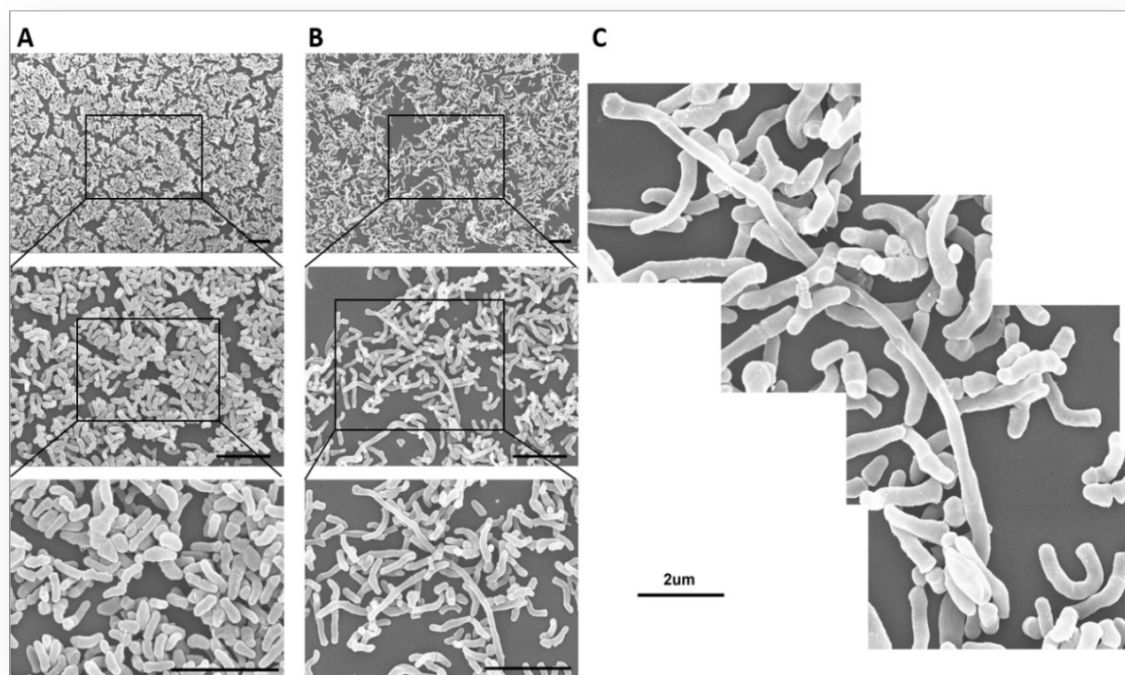
A III-as filogenetikai csoportba tartozó izolátumok morfológiájukban is eltérnek a többi izolátumtól, ugyanis ezek hosszú, elongálódott fenotípust mutatnak. A III-as filotípusba tartozó Asn12-es törzs genomját 2 kontigba építettük össze, majd a részleges genomot összevetettük a többi filotípusba tartozó genomokkal. Az egymáshoz való viszonyítás folyamán azonosítottunk egy 616A>G tranzíciós mutációt a GroEL chaperon fehérje kódoló szekvenciájában, amely 206 Treonin>Alanin aminosav cserét kódol (16. ábra) és kizárólag a III-as filogenetikai csoportba tartozó törzsekben van jelen. Mivel *E. coli*-ban a GroEL mutációja szintén elongálódott fenotípussal jár (Chapman, Farr és mtsa. 2006), ezért az adott mutációt megvizsgáltuk további 10, a III-as filogenetikai csoportba

tartozó törzsön, úgyelve a földrajzi diverzitásra: a törzsek között magyar (VA2_4, VA2_5, VA2_14); brazil (12S); brit (Asn10, Asn12, Asn13) és japán törzsek (55, 78, 124, 129) is voltak. Mivel az adott mutáció az összes III-as filogenetikai csoportba tartozó törzsben jelen van (16. ábra), ezért feltételezzük, hogy valóban ez a mutáció felelős az elongálódott fenotípusért: a kísérleti bizonyítás jelenleg is folyamatban van.

KPA171202_GroEL	AAGGGCTACATCTCGCCCTACTTCGTGACTGACACCGAGCGCATGGAGGCTGTCTCGAGGAT
	Lys Gly Tyr Ila Ser Pro Tyr Phe Val Thr Asp Thr Glu Arg Met Glu Ala Val Leu Glu Asp
Asn12_GroEL G
	Lys Gly Tyr Ila Ser Pro Tyr Phe Val Thr Asp Ala Glu Arg Met Glu Ala Val Leu Glu Asp
Asn10_GroEL G
	Lys Gly Tyr Ila Ser Pro Tyr Phe Val Thr Asp Ala Glu Arg Met Glu Ala Val Leu Glu Asp
Asn13_GroEL G
	Lys Gly Tyr Ila Ser Pro Tyr Phe Val Thr Asp Ala Glu Arg Met Glu Ala Val Leu Glu Asp
12S_GroEL G
	Lys Gly Tyr Ila Ser Pro Tyr Phe Val Thr Asp Ala Glu Arg Met Glu Ala Val Leu Glu Asp
VA2_4_GroEL G
	Lys Gly Tyr Ila Ser Pro Tyr Phe Val Thr Asp Ala Glu Arg Met Glu Ala Val Leu Glu Asp
VA2_5_GroEL G
	Lys Gly Tyr Ila Ser Pro Tyr Phe Val Thr Asp Ala Glu Arg Met Glu Ala Val Leu Glu Asp
VA2_14_GroEL G
	Lys Gly Tyr Ila Ser Pro Tyr Phe Val Thr Asp Ala Glu Arg Met Glu Ala Val Leu Glu Asp
55_GroEL G
	Lys Gly Tyr Ila Ser Pro Tyr Phe Val Thr Asp Ala Glu Arg Met Glu Ala Val Leu Glu Asp
78_GroEL G
	Lys Gly Tyr Ila Ser Pro Tyr Phe Val Thr Asp Ala Glu Arg Met Glu Ala Val Leu Glu Asp
124_GroEL G
	Lys Gly Tyr Ila Ser Pro Tyr Phe Val Thr Asp Ala Glu Arg Met Glu Ala Val Leu Glu Asp
129_GroEL G
	Lys Gly Tyr Ila Ser Pro Tyr Phe Val Thr Asp Ala Glu Arg Met Glu Ala Val Leu Glu Asp

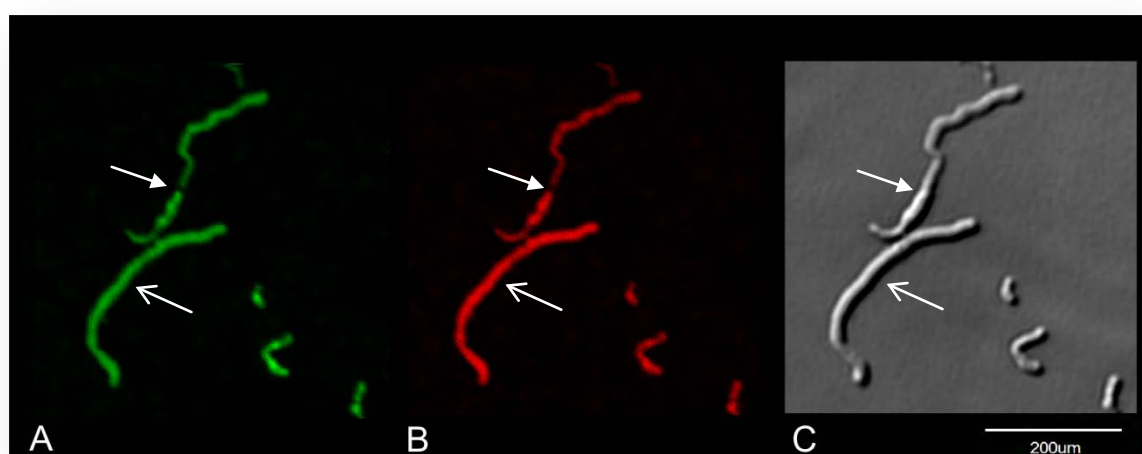
16. ábra Thr206Ala aminosav cserét okozó mutáció a III-as filogenetikai csoportba tartozó *P. acnes* törzsekben. Legfelső sorban a KPA171202-es IB típusú, mint referencia törzs GroEL részlete látható. Piros színnel jelölt a treonin (Thr) > alanin (Ala) mutáció.

A vizsgálataink során pásztázó elektronmikroszkópos (SEM) felvételeket készítettünk mind a megnyúlt, mind a normál morfológiát mutató törzsekről annak kiderítése érdekében, hogy a megnyúlt forma egyetlen sejt, vagy a sejtosztódás során valami oknál fogva szétválni nem tudó sejtek halmaza. A felvételek alapján elmondható, hogy a megnyúlt fenotípust mutató törzs sejt kultúrája nem homogén: láthatóak normál méretű sejtek és hosszú, elongálódott sejt típusok (17. ábra).



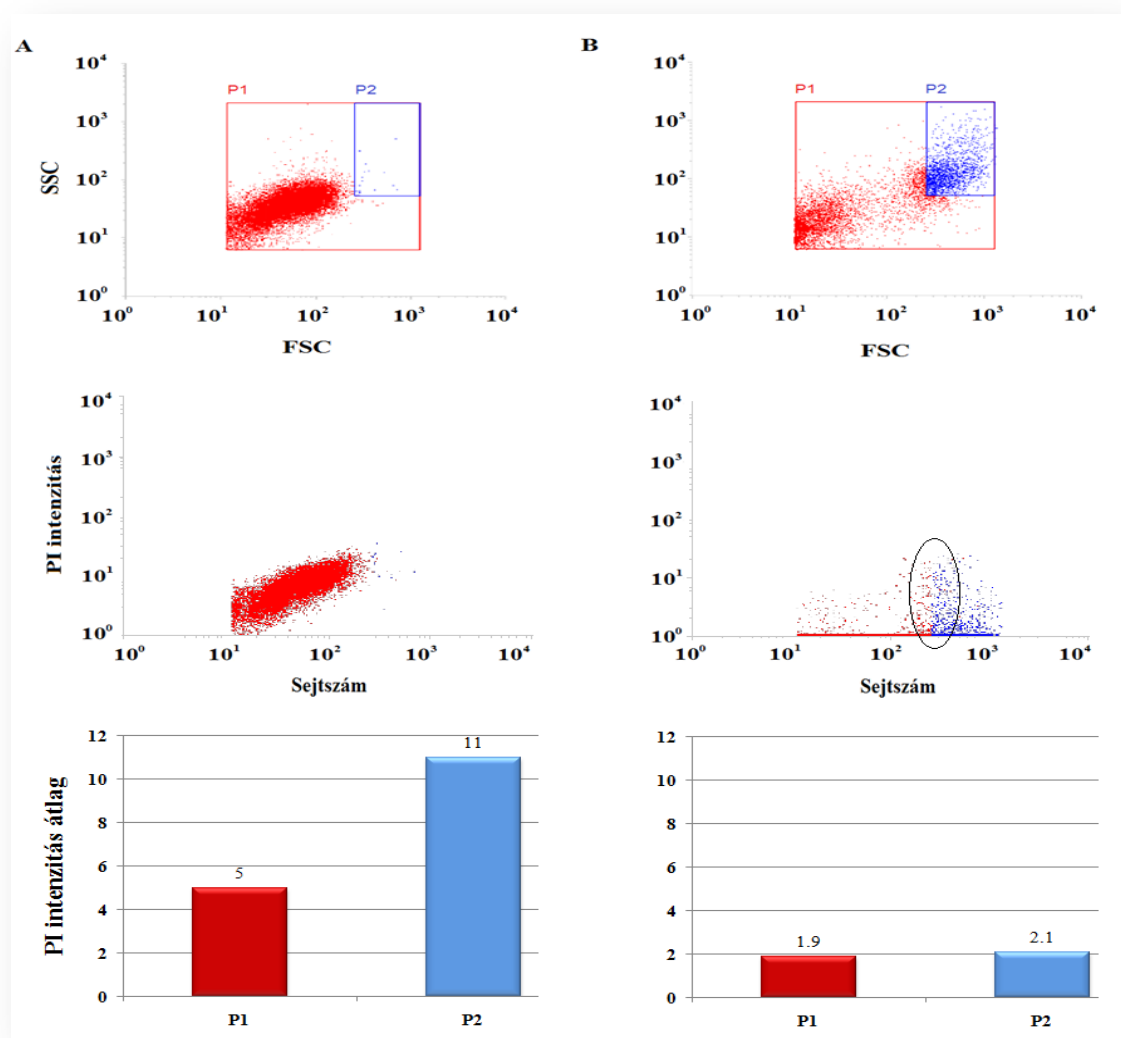
17. ábra. SEM (Scanning electron microscope) felvételek a *P. acnes* törzsekről. A: Az IA₁ filogenetikai csoportba tartozó PRP-60 törzs. **B-C:** A III-as filogenetiaki csoportba tartozó 12S megnyúlt fenotípusa.

A pásztázó elektronmikroszkópos felvételek mellett konfokális mikroszkópos vizsgálatokat is végeztünk. Míg a SEM-al a megnyúlt sejtek egyértelműen egy sejtnek látszanak, addig a konfokális mikroszkóppal látunk megnyúlt, egy sejtnek tekinthető sejtet, valamint több rövidebb, de befűződéssel együtt maradó, így látható fényben megnyúlnak tűnő sejtet.



18. ábra. Konfokális mikroszkóp felvételek a 12S (III-as típus) törzsről. A: FM-464 membrán festék; **B:** Nanoyl orange membrán festék. **C:** látható fény. Az ábrán látható teljes kitöltésű nyíl a befűződéssel együtt maradó sejtet mutatja, míg a pont nyíl az egy megnyúlt sejtet mutatja.

Annak érdekében, hogy kiderítsük valóban egy megnyúlt sejtet detektálunk, áramlásos citometriás vizsgálatokat végeztünk. Mivel a sejt kultúra nem homogén, az áramlásos citometriás méréseink során a sejt mérete alapján válogattuk szét a sejteket (19. ábra).



19. ábra. Áramlásos citometriás felvételek. A.: Kontrollként használt normál fenotípust mutató törzs citometriás felvétele. **B.:** Elongálódott fenotípust mutató törzs citometriás felvétele. FSC (forward scatter): korrelál a sejtek méretével. SSC (side scatter): a sejtek granuláltságát határozza meg. A kísérlet során a sejtek méret szerinti elkülönítését a P1-es kapu (piros színnel) és a P2-es kapu (kék színnel) jelzi. A kontrollként használt mintában a P2-es kapuban megjelenő sejtek nagy valószínűséggel aggregált sejtek melyektől nem sikerült megszabadulni a szonikálás alkalmával, azonban a mennyisége az összes leemelt sejthez képest csak 0,09%. A fekete kiemelt terület a feltehetőleg a két szétosztódni nem tudó sejt populációját ábrázolja. .

A sejtek DNS tartalmát ezután propidium-jodid (PI) DNS interkaláló, fluoreszcens festék intenzitása alapján határoztuk meg. A kísérlet során két kaput használtunk, két egymást követő lépésben. Az első szétválogatás alkalmával a nagyobb mérettartományban

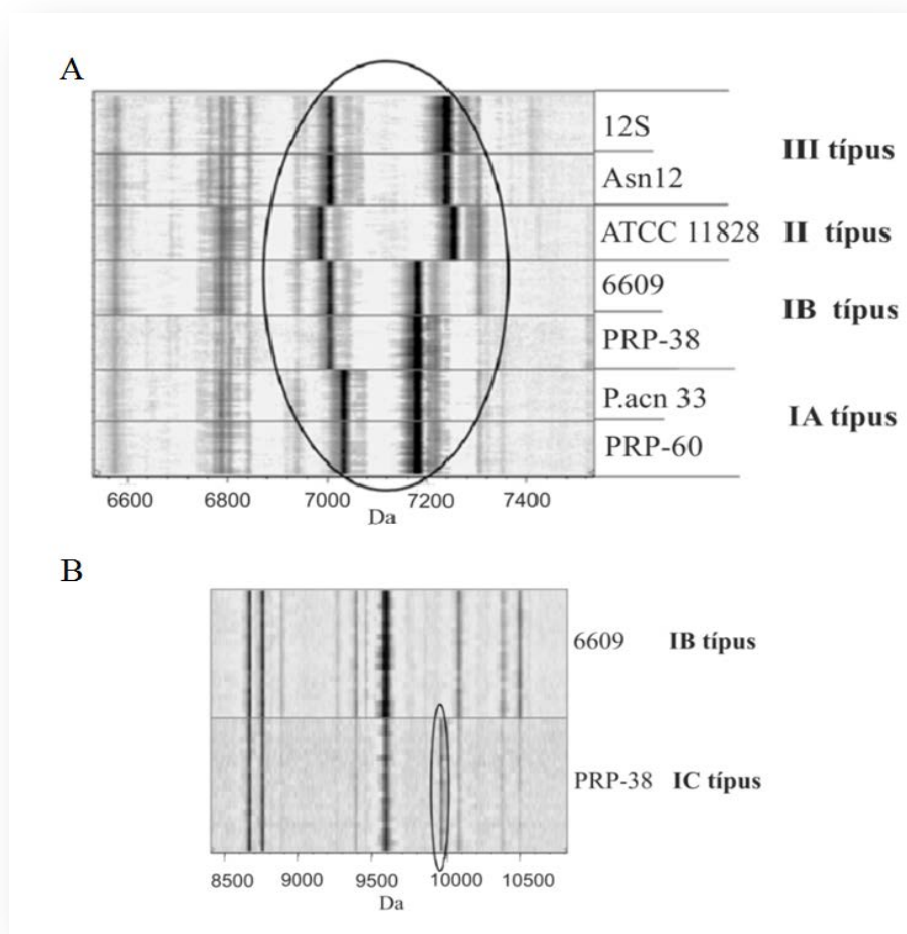
elhelyezkedő sejteket válogattuk ki (Függelék 1-2. ábra), majd ezeket a sejteket újból szelektáltuk a méretük alapján. Végül két jól elkülönülő populációt azonosítottunk. Összehasonlítva a két populációt elmondható, hogy a nagy mérettartományban elhelyezkedő sejteknek PI intenzitása szinte alig változott a kisebb mérettartományban elhelyezkedő sejtekével. Ebből arra következtethetünk, hogy a sejtek DNS tartalma megegyezik, mindezek alátámasztják a mikroszkópos felvételeink során tapasztaltakat, miszerint a sejt kultúrában az egy megnyúlt fenotípust mutató sejt valóban egyetlen sejtnek tekinthető.

4.5 MALDI-TOF MS analízis

MALDI-TOF MS a különböző baktériumok, gombák fajszerű meghatározására széleskörben elfogadott módszer (mint pl. *Bacteroides fragilis* vagy a *Yersinia enterocolitica* azonosítása során (Stephan, Cernela és mtsa. 2011). A fajszerű azonosítás során a riboszómális fehérjék tömegspektrumát vizsgálják, így fontos a vizsgálandó minta frissessége, hiszen a tenyészet öregedésével a fehérjék degradációja növekszik, ami az azonosítás hatékonyságát csökkenti. Ugyanakkor a törzs szintű azonosítás növekvő tendenciát mutat, amit a törzsre jellemző markerek felderítésével végeznek (Croxatto, Prod'hom és mtsa. 2012). Azzal a céllal, hogy az általunk kidolgozott eMLST módszer megbízhatóságát alátámasszuk, 61 *P. acnes* törzsön MALDI-TOF MS analízist végeztünk (Függelék 1. táblázat). MALDI-TOF MS kísérleteink során 13 izolátum genotípusát meghatároztuk az általunk kidolgozott eMLST módszerrel, így az analízis során, mint referencia törzsek szerepelnek. Ebben a kísérletben a klinikai izolátumokat a szegedi Klinikai Mikrobiológiai Diagnosztikai Intézet biztosította számunkra. A 48 izolátum tömegspektrum felvétele lineáris, pozitív ionmódban történt. Az ismert genotípusú minták tömegspektrumbeli különbségeit gél-alapú analízissel követtük nyomon, ami alapul szolgált a klinikai izolátumok azonosításának.

Az általunk használt szoftver (MALDI Biotyper) a feltehetőleg azonosított fajokat rangsorolja egy "log score" (LS) érték alapján. Ez az érték tükrözi az ismeretlen izolátum spektrumainak az egyezését és az intenzitását az adatbázisban lévő spektrumokkal, amely eredményeként a szoftver egy nulla és három közé eső LS értéket generál. Általánosan elfogadott, hogy ha az LS érték 2 és 1.7 között van akkor a vizsgált izolátum ugyanabba a nemzetségbe tartozik, de más faj, míg a 2 feletti érték faj szintű azonosítást jelent (Lartigue, Héry-Arnaud és mtsa. 2009). Kísérleteink során a generált LS értékek kettő felettiak voltak (átlag: 2,34), így nagy biztonsággal tudtuk elkülöníteni a *P. acnes*

izolátumokat más *Propionibacterium* fajoktól. Gél alapú analízis során a referencia törzsekben jól láthatóan körvonalazódtak a tömegspektrumbeli különbségek (20. ábra).



20. ábra. A referencia *P. acnes* izolátumok gél-alapú tömegspektrum felvétele. A: az azonosítás alapjául szolgáló tömegspektrum különbségek az adott izolátumokban. Az I-es filogenetiai csoportba tartozó összes izolátumnál megtalálható a 7004Da m/z (m: tömeg; z: töltés) régióban lévő spektrum. Azonban a 6900-7300 Da-os régiónak a vizsgálata nem elegendő az IA típusokon belüli és az IB/IC típusok azonosítására. **B:** 9950 Da régióban a PRP-38-as az eMLST alapján IC típusnak azonosított mintában egy további spektrum látható, ami így segítségül szolgál az IC izolátumok azonosítása során.

A felvételek alapján meg lehet különböztetni az I-es filogenetikai csoporton belül az IA és IB típust, azonban az IA csoporton belül az IA₁ és IA₂ között nem tud különbséget tenni. Továbbá az IB típus spektrumához nagyon hasonló IC típust csak egy távolabb lévő régióban detektálható csúcs alapján lehet azonosítani. A következő két filogenetikai csoport nevezetesen a II-es és a III-as ellenben nagy biztonsággal beazonosítható (9. táblázat). Ily módon a 48 klinikai izolátum közül 19 bizonyult IA típusnak, 21 izolátum IB típusnak és 8 minta II-es típusnak a tömegspektrometriai analízis során. A kísérleteink

alkalmával az izolátumok filogenetikai csoportba sorolásához 24 órás preparátumokat készítettünk. A továbbiakban megvizsgáltuk a tenyésztési idő hatását a csoportba sorolásra. Összehasonlítva a 48 órás preparátumokkal a tömegspektrumok felvétele során az LS érték kis mértékben csökkent (átlag: 2,276) azonban az azonosításhoz szükséges fő spektrumok nem változtak. Összességében elmondható, hogy a MALDI-TOF MS módszer felbontása kevésbé érzékeny, a fő filogenetikai csoportokba való besorolásra azonban alkalmas. Ennek ellenére nem kapunk pontos képet a nagyobb filogenetikai csoportokba besorolt izolátumokról, ellentétben az általunk kifejlesztett eMLST módszerhez.

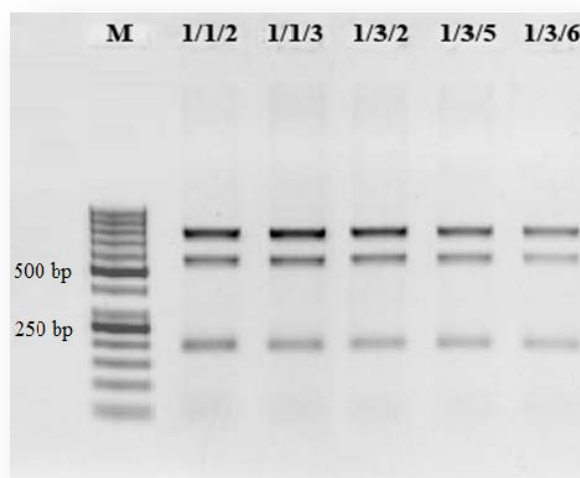
<i>P. acnes</i> referencia izolátumok	Jellemző tömegspektrum	eMLST filotípus	Tömegspektrum alapú csoportosítás
PRP-60	7034,7180	IA1	IA
<i>P. acn</i> 33	7034,7180	IA2	IA
<i>P. acn</i> 17	7034,7180	IA2	IA
<i>P. acn</i> 31	7034,7180	IA2	IA
6609	7004,7180	IB	IB
PRP-38	7004,7180,9950	IC	IC
ATCC11828	6985,7525	II	II
76618	6985,7525	II	II
12S	7004,7238	III	III
Asn12	7004,7238	III	III
VA2/5	7004,7238	III	III
Asn10	7004,7238	III	III

9. táblázat. A referencia *P. acnes* izolátumok tömegspektrumai és ez alapján a filogenetikai csoportok meghatározása.

4.6 Klinikai minták tipizálása

A klinikai mintagyűjtés során az aknés betegek arcáról jelenleg többnyire törléssel gyűjtik a mintákat, majd ebből szemi-szelektív táptalajon kerül kitenyésztésre a *P. acnes*. Könnyen belátható, hogy ily módon ebbe a tenyésztésbe az opportunistá patogének át a normál flóra tagjai, vagyis a kommenzalisták is bekerülhetnek. Ez viszont azzal a veszéllyel fenyeget, hogy egy-egy ártalmatlan törzset patogénnek tipizálnak. Annak érdekében, hogy a potenciálisan patogén törzseket pontosan elkülönítsük, és a későbbiekben ezek molekuláris jellemzésével gyógyszercélpontokat azonosítsunk, a klinikai mintavételezést is finomítottuk. A nantesi Bőrklínika bőrgyógyászai ezért immáron specifikusan az egyes aknés betegek papulláiból, pustuláiból, komedójáiból, valamint proximális egészséges bőrfelületről gyűjtötték számunkra a mintákat. Ez a

mintavételezés lehetőséget nyújtott számunkra, hogy a *P. acnes* kolonizációjának dinamikáját intra- és interperszonális szinten is vizsgáljuk.



21. ábra. Egyetlen beteg egy pusztulájából izolált *P. acnes* törzsek multiplex PCR-el való tipizálása. M: 50 bp marker

Ezt a mintavételezési stratégiát felhasználva teszteltük azt a feltételezésünket, amely szerint egy adott folliculust azonos filogenetikai csoportba, sőt azonos e-szekvencia típusba (eST) tartozó törzs kolonizál. Amennyiben az adott mikro környezetben a patogén törzsek túlnövik a kommenzalistákat, acne vulgaris alakulhat ki. A betegekről származó minták multiplex PCR-es tipizálása igazolta hipotézisünket (21. ábra): az egyes betegek különböző aknés területeiről ugyan más-más eST-be tartozó *P. acnes* törzseket izoláltunk, azonban az adott folliculuson belül ugyanabba az eST-be tartozó törzsek találhatóak. Néhány esetben ugyan a beteg területekről izolált törzsek között nemcsak a patogénnek számító IA₁, IA₂ és IC típusba tartozó törzseket izoláltunk, hanem elvéve IB típusú törzseket is, azonban ez nagy valószínűséggel a környező egészséges területekről származó kommenzalista „szennyeződés”, amely a mintavételezéskor kerülhetett a mintába (nem mutatott adatok).

Kísérleti felállásunkban minden egyes folliculusból 5-8 törzset tenyésztettünk ki. Habár a multiplex PCR-el történő gyors tipizálással egyértelműen megállapítottuk az izolátumok típusát, az eMLST felhasználásával tovább finomítottuk a felbontást. A multiplex PCR-es eredményeink alapján azt már tudtuk, hogy az adott folliculusból kitenyésztett izolátumok ugyanabba a filogenetikai típusba tartoznak, ezért a továbbiakban csak 2-2 izolátumnak határoztuk meg az eMLST allélkombinációját. Megállapítottuk, hogy

az adott folliculuson belül az izolátumok ugyanabba a szekvencia típusba tartoznak. Ezek az eredmények egyértelműen bizonyítják, hogy egy-egy folliculust kizárólag egyetlen törzs kolonizál. A 10. táblázat összesíti 5 acne vulgarisban szenvedő beteg kezelési adatait, valamint a kitenyészett *P. acnes* izolátumok tulajdonságait.

Antibiotikum kezelés az elmúlt 1 évben		Aktuális akne kezelés a mintavétel pillanatában			Izolálási terület	Izolált törzs	Izolált ST
	igen/nem	topikális/szisztémás	milyen	mióta			
1	nem	szisztémás	Isotretinoin	8 hónap	pusztula	IA ₂	eST-2
					comedo	IA ₂	eST-2
					pusztula	IA ₂	eST-22
					normál	IB	eST-5
2	igen szisztémás (limeciclin)	topikális	BPO	2 hónap	pusztula	IA ₁	eST-3
					papula	IA ₁	eST-1
					pusztula	IA ₁	eST-4
					normál	IB	eST-5
3	nem	szisztémás	Spironolacton	3 hónap	papula	IA ₁	eST-3
					papula	IA ₁	eST-4
					papula	IA ₁	eST-4
					normál	IB	eST-5
4	nem	szisztémás	Isotretinoin	1 hónap	papula	IA ₂	eST-22
					papula	IA ₂	eST-2
					papula	IA ₂	eST-2
					normál	IB	eST-5
5	igen szisztémás (limeciclin)	topikális	BPO	2 hónap	papula	IC	eST-85
					comedo	IC	eST-70
					pusztula	IC	eST-85
					normál	IB	eST-5

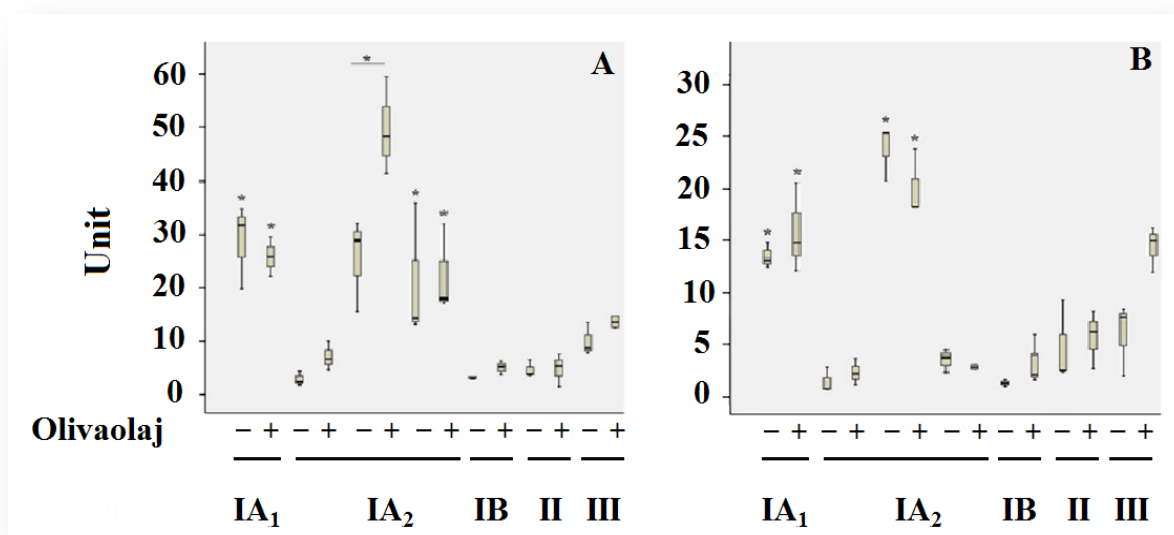
10. táblázat. Aknés betegek kezelési előzményei, valamint a kitenyészett *P. acnes* izolátumok jellemzése. BPO: benzoi-peroxid.

4.7 Triacilglicerol lipáz aktivitásának vizsgálata

Vékonyréteg kromatográfia

Az extracelluláris lipázok (legfőképpen triacilglicerol-hidroláz) olyan hidrolitikus enzimek melyek az olajat és a zsírokat hidrolizálják két lépésben. Először szubsztituált gliceridek és zsírsavak keletkeznek, majd ezek teljes hidrolízisével glicerol és zsírsav jön létre. Ezt a jelenséget kihasználva vékonyréteg kromatográfias (TLC) lipáz aktivitás mérést végeztünk el a kiválasztott izolátumokon.

Az alternatív zsírbontási útra kényszerítve a baktériumok anyagcseréjét, a kiválasztott izolátumokat olivaolajjal növesztettük együtt. Minden egyes új gél futtatásánál meghatározott koncentrációjú olajsav analitikai standardot használtunk 10^{-1} - 10^{-7} -es hígításban és így a kapott kalibrációs egyenes egyenletének a felhasználásával állapítottuk meg a különböző izolátumok enzimaktivitását (Függelék 3. ábra). Az így növesztett, patogén IA₁ (PRP-60) és IA₂ (P.acn17, P.acn 31 és P.acn33) filogenetikai csoportba tartozó izolátumok, minden esetben előbb érték el az exponenciális fázist, összehasonlítva a kommenzalista IB (6609), II-es (ATCC11828) és III-as (12S) filogenetikai típusú izolátumokkal. A kísérleteinkben a hidrolízis során keletkezett olajsavat mértük szemben a szubsztrátként használt triolein fogyasztásával.



22. ábra. Triolein hidrolízise olajsavvá 3 (A) és 24 óra (B) elteltével. Az x tengelyen a kiválasztott izolátumok láthatóak a tenyésztési körülménnyel: + olivaolajjal indukált növesztés, - olivaolaj nélküli növesztés. A hidrolízis mértékét unit egységben fejeztük ki (U). A legkevesebb fehérjetartalmú mintánkhoz igazítva így 1 unit az a mennyiség, ami 1 óra alatt 350 µg/ml olajsavat szabadít fel. Az izolátumok: IA₁: PRP-60; IA₂: Pacn33, P.acn17, P.acn31; IB: 6609; II: ATCC11828; III: 12S voltak. A minták közti szignifikáns különbségek meghatározásához a Bonferroni és LSD (Least Significant Difference) tesztet használtuk. Az egyes értékek közti különbségeket szignifikánsnak a $p < 0,05$ teljesülése esetén tekintettük, $n \leq 6$.

A különböző filogenetikai csoportba tartozó izolátumok hidrolízise izolátum specifikus mintázatot mutat (Függelék 2. táblázat). Az acne vulgarisból származó IA₁ (PRP-60) izolátum nagy hidrolitikus aktivitással rendelkezik attól függetlenül, hogy indukálva volt olivaolajjal vagy sem (U_o: 25 (az olivaolajjal indukált minták U egységei); U: 28). Ezzel ellentétben az egészséges bőrről izolált IB típusú törzsnek (6609) van a legkisebb aktivitása (U_o: 5; U: 3). Ezek alapján a magas alapaktivitással rendelkező patogén törzsek jobban redukálják a szébum zsírsavait, ezáltal szerepet játszva a baktérium virulenciájának a növelésében. A következő három IA₂ típusba sorolt izolátum közül a P.acn33 mutatta a legkisebb aktivitást (U_o: 7; U: 3). Noha nem acne vulgaris-ból származnak az izolátumok, a további két törzs számottevő hidrolitikus aktivitással rendelkezik. A P.acn17 az összes minta között a legnagyobb aktivitást mutatta: olivaolaj hatására majd kétszeresére növekedett az aktivitása (U_o: 50; U: 26). Az utolsó izolátum az IA₂ csoportból (P.acn31), hasonlóan az IA₁ izolátumhoz nagy alap aktivitással rendelkezett, azonban megállapítható, hogy indukció hatására alig változott az aktivitása (U_o: 22; U: 21). További két fő filogenetikai típus izolátumai - nevezetesen az ATCC11828 (II) és a 12S (III) - nem mutattak számottevő különbséget az aktivitásukban az inkubációt követően (ATCC11828: U_o: 4,8; U: 4,6, 12S: U_o: 13; U: 10). A többi mintával összehasonlítva aktivitásuk átlagosnak mondható, megerősítve azt a hipotézist, miszerint kevésbé virulensek.

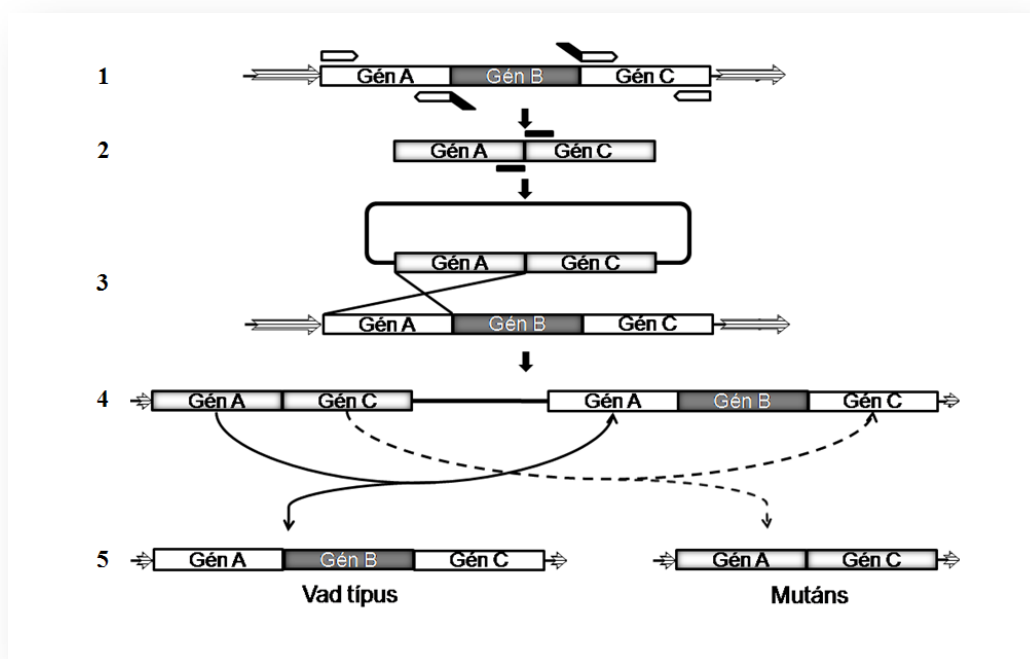
A huszonnégy óra inkubáció elteltével a minták zsírsav hidrolízisének mintázata alig változott. A patogénnek számotartott PRP-60 (IA₁) izolátum alapaktivitása ismételtén magas, indukció hatására az aktivitása nem változott szignifikánsan. Az IA₂ izolátumok közül a P.acn17-es minta aktivitása újból kiemelkedően magas volt, az összes izolátum között a legmagasabb. Az IB csoportba tartozó egészséges bőrről származó izolátum (6609) indukció nélküli mintája mutatta a legkisebb aktivitást (U_o:3; U:1) így a statisztikai analíziseink során abszolút kontrollként használtuk fel. Összegezve elmondható, hogy a patogén IA₁ és IA₂ típusú izolátumok lipáz aktivitása magas, szemben a II-es és a III-as típusba tartozó kommenzalista törzsekkel. Vélhetően a baktériumok hidrolitikus aktivitása hozzájárulhat a virulenciájuk növeléséhez azáltal, hogy saját magának állítja elő az energiaforrást, így növelve a túlélésének az esélyét.

4.8 PRP-38-as törzs mutagenezise

Ahhoz, hogy a baktérium virulenciájának kialakításában részt vevő géneket vizsgáljunk, nélkülözhetetlen egy hatékony génkiütési rendszer. Az első génkiütést *P.acnes*-ben inszerciós mutagenezissel hajtották végre. Szelekciós markerként az acne vulgaris kezelésére is széleskörben elterjedt antibiotikumot, nevezetesen az eritromicint választották (Sörensen, Mak és mtsa. 2010). Azonban a klinikai izolátumok körében már 2000-ben az eritromicin rezisztencia mértéke 55% volt, így belátható, hogy szelekciós markerként az eritromicin használata nem túl szerencsés (Leyden JJ 2008). Ezért a következő kísérletben varrásmentes, antibiotikum-rezisztencia gén inszerciója nélküli mutagenezist valósítottunk meg.

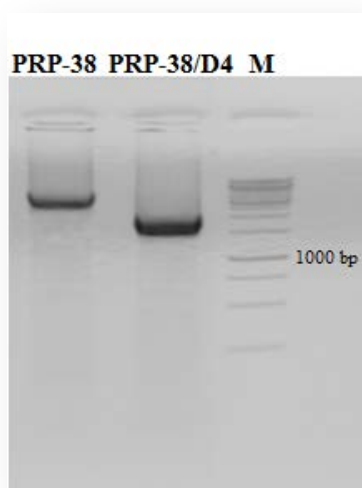
Az acne vulgaris kialakulásában potenciális patogén faktor a faggyú túltermelődése. A megtermelődött szébum gazdag lipidekben, így az itt élő baktériumok számára kiváló energiaforrás. A vékonyréteg kromatográfiás kísérleteink során már bebizonyosodott, hogy a feltételezhetően patogén izolátumoknak magasabb a hidrolitikus aktivitása. Ennek okán a mutagenezis kísérletünkhöz olyan izolátumot választottunk, amit acne vulgaris-ból izoláltak és magas alap hidrolitikus aktivitással rendelkeznek.

Egy DNS szakasz homológ rekombinációval genomba való beintegrálására és kiütésére két lehetőség létezik: az egyszeres- és a kétszeres rekombinációval történő rekombináltatás. Első esetben a genom a teljes plazmidot fogja tartalmazni és ez esetben elég egyetlen homológ szakasz jelenléte a plazmidon. A kétszeres rekombinációnál két homológ régiót kell tartalmaznia a plazmidnak és a kétszeres rekombináns csak a két homológ régió közötti DNS szakaszt fogja tartalmazni. Az egyszeres rekombinánst könnyebb előállítani mivel csak egy rekombinációs eseményre van szükség, viszont fennáll a lehetősége annak, hogy a plazmid kirekombinálódik a genomból. Viszont ennek a lehetősége az antibiotikum-rezisztencia gének alkalmazásával kiküszöbölhető. A kettős rekombináció esetén ugyan nehezebb előállítani a konstrukciót, de a törzs jóval stabilabb. Kísérleteink során a transzformáló konstrukciónkat úgy terveztük meg, hogy csak a gén előtti és mögötti homológ régiókat tartalmazza, így antibiotikum-rezisztencia gén inszerciója nélküli génkiütést végeztünk el az általunk kiválasztott PRP-38-as izolátumon. A kiválasztott génünk a baktérium lipolitikus metabolizmusában részt vevő *gehA* gén, melynek delécióját a 23. ábra foglalja össze.



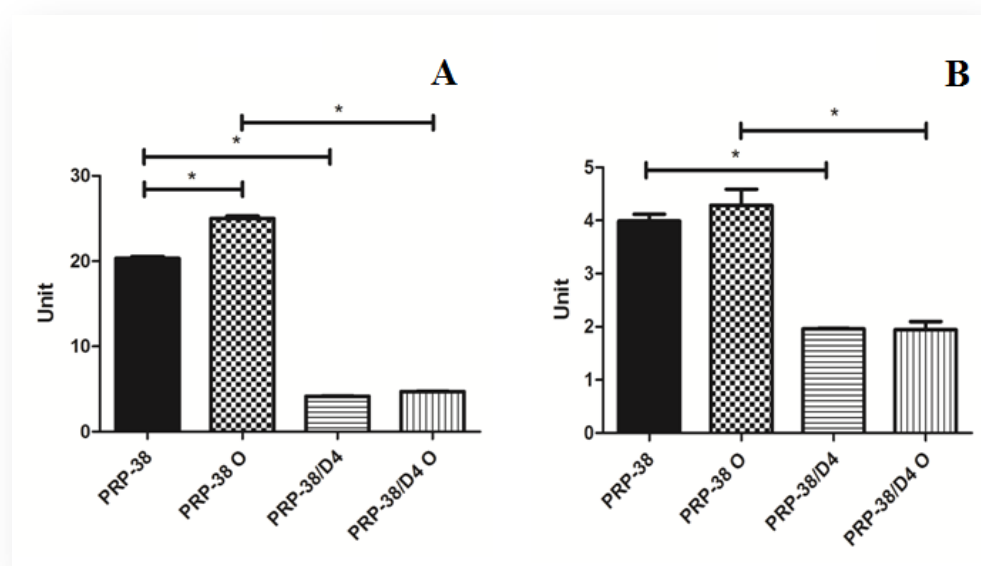
23. ábra. A *gehA* gén deléciója kettős homológ rekombinációval. 1. A deléciós kazetta összeszerelése két PCR reakcióval. 2. Az így előállított fragment ligálása a megfelelő vektorba. 3. Vektor transzformálása a kiválasztott izolátumba. 4. Az első homológ rekombináció során kapott gének sorrendje. 5. A második homológ rekombináció bekövetkeztekor létrejövő génsorrend. A plazmid rezisztenciáját elveszítve a populáció ~50%-a mutáns.

Elsőként a deléciós kazettánkat állítottuk össze majd egy *E.coli* kompetens sejtbe tarnszformáltuk. A számos sikertelen elektroporáció után végül protoplasztálással sikerült bejuttatnunk az inszertet tartalmazó, kanamicin szelekciós markert hordozó plazmidunkat a PRP-38-as izolátumunkba. Az egy hét után megjelenő pozitív klónok közül egyet kiválasztottunk és kanamicines, illetve kanamicin nélküli lemezekon replikákat készítettünk. Legalább tíz passzáls szükséges ahhoz, hogy a rekombinációs esemény mindkét homológ szakasz érintésével végbemenjen. A replikálás után a szelekciós markert elvesztő klónok feltehetőleg a mutáns egyedek. A mutáns populáció ~50% lesz az, amely valóban mutáns és a gén ki van ütve, a fennmaradó ~50% pedig ahol a gének sorrendje megegyezik a vad típuséval. A pozitív klónjainkon a kiütendő génünktől feljebb és lejjebb tervezett primerpárral ellenőrző PCR-t hajtottunk végre, ami alapján elmondható, hogy a mutáns törzsünk (PRP-38/D4) ampikonja 924bp-al kisebb, ami a *gehA* gén kiütését jelenti (24. ábra).



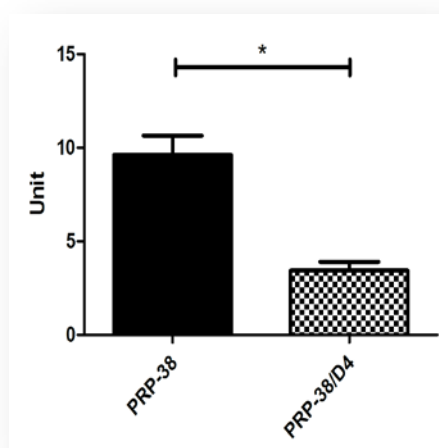
24. ábra. A deletált géntől up- és downstream tervezett primerekkel történő ellenőrző PCR reakció. 1. Vad típusú törzs amplikonja (PRP-38). 2. Mutáns törzs amplikonja (PRP-38/D4, melyen látható a 924 bp elvesztése. M.: 1000bp-os DNS marker.

Az így előállított deléciós mutánsunk hidrolitikus aktivitását TLC és fluorometriás kísérletekben vizsgáltuk meg. A kromatográfiás analízisekben a kísérleti felállás megegyezett a 4.7-es pontban leírtakkal.



25. ábra. A vad típusú (PRP-38) és a mutáns törzs (PRP-38/D4) hidrolízisének az összehasonlítása TLC kísérlettel. A: 3 órá, B: 24 órá inkubációs idő. Minden esetben a mutáns törzs aktivitása legalább a felére csökkent összehasonlítva a vad típusussal. Az egyes értékek közti különbségeket szignifikánsnak a $p < 0,05$ teljesülése esetén tekintettük. $n \leq 6$.

Összehasonlítva a többi izolátummal elmondható, hogy a PRP-38-as törzsnek az alap hidrolitikus aktivitása magas, indukció hatására tovább növekedett a 3 és 24 órás inkubáció során. Ezzel szemben a mutáns törzs alig mutatott aktivitást indukció nélkül és indukció hatására egyaránt. A továbbiakban, hogy még pontosabb képet kapjunk a mutáns törzs aktivitásáról fluorometriás kísérleteket végeztünk el. A pontos szubsztrát-specifikus hidrolitikus aktivitását a törzseknek 4-metilumbelliferil-oleát fluorogénikus szubsztrát felhasználásával végeztük el (Függelék 4. ábra).



26. ábra. A PRP-38/D4 mutáns törzs hidrolitikus aktivitása. Unit egységekben kifejezve a két törzs aktivitása, $p < 0,05$, $n=3$.

A kísérleteink alapján elmondható, hogy a mutáns törzsünk lipáz aktivitása egy harmad részre csökkent, összehasonlítva a vad típussal. Az általunk előállított mutáns törzs alapvető jelentőségű az acne vulgaris patomechanizmusának megértéséhez. Továbbá az általunk kidolgozott mutagenézis stratégia felhasználható olyan faktorok vizsgálatához, melyek szerepet játszhatnak az acne vulgaris kialakításában.

5. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

Az emberi mikrobióta diverzitásának a törzs szintű feltérképezése és tanulmányozása meghatározó jelentőségű. Nagy valószínűséggel nem egy faj, hanem egyes törzsei játszhatnak szerepet bizonyos fertőzések kialakításában, mint pl. a *Staphylococcus aureus* meticillin rezisztens törzse, vagy az *E.coli* O157-es törzse esetén is (Tarr, Gordon és mtsa. 2005; Chambers és Deleo 2009). Bőrünkön, szervezetünk első védelmi vonalán nemcsak kommenzalista, hanem patogén formában is előforduló *P. acnes* egy Gram-pozitív, coryneform, nem spórázó, anaerob, opportunistá baktérium, amelyet számos kórkép megjelenésével hoztak összefüggésbe. Leggyakrabban az acne vulgaris kialakításában játszik szerepet, amely egy multifaktoriális eredetű betegség és a pilosebaceous follikulusok krónikus gyulladása jellemzi. Habár az acne patogenezise máig nem pontosan ismert, a *P. acnes*-nek meghatározó jelentősége van a betegség kialakításában (Webster 1995). Éppen ezért, annak a jelentősége, hogy gyorsan és pontosan képesek legyünk besorolni az izolátumokat, egyre növekszik.

A gyógyászatban széleskörűen alkalmazott antibiotikumok hatása általánosságban véve is gyengülni látszik és igaz ez a *P. acnes*-el szemben is. Az antibiotikumok nemcsak túlzott, de helytelen alkalmazása során egyre több antibiotikum rezisztens törzs jelenik meg. Számos tanulmány taglalja, hogy a patogén baktériumok szaporodását célzott terápiával képesek lehetünk meggátolni, ezzel párhuzamosan megőrizve és fenntartva a bőrünkön élő kommenzalista mikroflórát. Feltételezéseink szerint ez nagy valószínűséggel igaz lehet a *P. acnes* esetében is.

A baktérium filogenetikai csoportosítására elsőként sejtfal cukor-összetétel meghatározást és agglutinációs tesztet alkalmaztak, majd bakteriofág és fermentációs alapú csoportosítást használtak (Kishishita, Ushijima és mtsa. 1979). Ezt követően molekuláris PCR alapú módszerekkel, mint az RFLP analízis (Restriction Fragment Length Polymorphisms) és a 16S rDNS amplifikációjával majd a szekvenciájának meghatározásával különítették el a *P.acnes* izolátumokat (Hykin, Tobal és mtsa. 1994). Azonban a nagyfokú konzerváltság és a szekvencia rövidege nehezíti a törzsek közötti különbségek meghatározásának lehetőségét (Riedel, Wingfield és mtsa. 1998). A részletesebb felbontás növelése érdekében Perry és munkatársai elsőként a „klasszikus” *Propionibacterium*-okra alkalmazott RAPD módszert, alkalmazták a bőrről izolált baktérium esetében (Matte-Tailliez, Lepage és mtsa. 2002; Perry, Worthington és mtsa. 2003). A RAPD alkalmazása során egy rövid oligonukleotid (10 nukleotid) primer

felhasználásával random DNS fragmentek amplifikációja történik. Az amplifikált termékek gélen való futtatása révén a törzsekre jellemző mintázat alapján az izolátumok elkülöníthetőek. Munkánk megkezdésekor RAPD módszerrel jellemeztük törzsgyűjteményünket. Kísérleteinkben elsőként a telepmorfológia alapján szelektáltuk az izolátumainkat. A RAPD analízis során, sajnos a módszer hátrányából adódóan teljes bizonyossággal nem tudtuk besorolni az izolátumainkat. A RAPD markerek alacsony információ tartalma a DNS templát mennyisége és a véletlenszerű párosodás eredményeként a törzsekre jellemző amplikon mintázat még két párhuzamos mintában is eltérhet. Mindezek tudatában kutatócsoportunk új tipizálási módszereket dolgozott ki.

Ahhoz, hogy a tipizálási módszer egy adott mikroorganizmus analízisére megfeleljen, több kritériumnak is teljesülnie kell. Belátható, hogy a legfontosabb kritérium a módszer diszkriminatív értéke, azaz a felbontóképessége. Ez az érték mutatja meg, hogy a vizsgálandó törzsek közül mennyit tud elkülöníteni az alkalmazott módszer. Ha a felbontóképessége túl nagy, akkor még az egy klónba tartozók is különbözni fognak, míg ha meglehetősen kicsi, akkor az egyértelműen különböző izolátumok is egy csoportba kerülhetnek. Mindezeket figyelembe véve a Belfasti Egyetem Immunológiai intézetével közösen egy olyan multiplex PCR (MPCR) alapú genotipizálási módszert dolgoztunk ki, amely gyors, felbontóképessége nagyobb mint a RAPD módszeré és könnyen reprodukálható. A MPCR-t elsőként 1988-ban használták, majd folyamatosan elterjedt a nukleinsav alapú diagnosztikában, mint pl. deléciók analízisében, mutációk és polimorfizmus vizsgálatokban és az RNS detektálásában (Chamberlain, Gibbs és mtsa. 1988; Shuber, Skoletsky és mtsa. 1993; Zou, Stansfield és mtsa. 1998). Továbbá alkalmazzák még fertőző betegségekből patogének azonosítására: vírus-, bacterium- és parazita szinteken is (Cassinotti és Siegl 1998; Coton és Coton 2005; Liu, Zhou és mtsa. 2012; Anderson, Werno és mtsa. 2013). Míg a legtöbb tipizálási módszer a törzsek közti hasonlóságon alapszik (pl.: RAPD, MALDI-TOF MS), addig az általunk kidolgozott MPCR a törzsek közti különbségeket célozza meg. A specifikus primerek tervezése során olyan régiókat választottunk ki, melyek csak az egyes filogenetikai törzsekre jellemzőek, így a 6 primerpár egy reakcióban történő használatával egyedi amplikon mintázat látható. Szem előtt tartva az izolátumok tipizálásával kapcsolatos szempontokat (gyors, reprodukálható és elegendően nagy felbontóképességű) módszerünket kolónia PCR-ben is teszteltük. A primerek pontos koncentrációjának a beállítása után a törzsgyűjteményünk, és a folyamatosan érkező klinikai minták genotipizálása során megállapítottuk, hogy a MPCR

6 filogenetika csoportba képes sorolni az izolátumokat, ellentétben a RAPD-val, amely csak 3 nagy filogenetikai csoportot különböztet meg.

Az 1998-ban kidolgozott MLST filogenetikai osztályozás, egy olyan molekuláris biológiai módszer, amely számos (hat vagy hét) háztartási gén internális régiójának a polimorfikus nukleotid szekvenciájának az azonosításán alapszik (Maiden, Bygraves és mtsa. 1998; Enright, Day és mtsa. 2000; Miragaia, Thomas és mtsa. 2007; Raftis, Salvetti és mtsa. 2011). Az azonosított génszekvenciák különböző allélokot határoznak meg, így minden egyes allélkombináció szekvencia típusba sorolható. Elsőként 2010-ben alkalmazták az MLST analízist *P. acnes*-re, melyben 9 háztartási és 2 virulencia gént használtak fel (MLST9) (Lomholt és Kilian 2010). A 201 izolátumot 57 szekvencia típusba sorolták, és a populáció diverzitásának a vizsgálatkor 8 csoportot azonosítottak (Lomholt és Kilian 2010). Belátható, hogy nagyszámú izolátumok rutinszerű tipizálására 11 lókuszt vizsgálata nehezen kivitelezhető és költséges. Laboratóriumunk részt vett a 7 konzervált háztartási gén részleges nukleotid szekvencia analízisén alapuló MLST kidolgozásában. (McDowell, Gao és mtsa. 2011). A módszer során az *aroE*, *atpD*, *gmk*, *guaA*, *lepA*, *recA* és *sodA* gének részleges szekvenciáit amplifikáltuk, kapilláris elektroforézis szekvenálással meghatároztuk a pontos nukleotid sorrendet, majd az MLST adatbázisba történő feltöltésük után megállapítottuk a szekvencia típusokat (<http://pubmlst.org/pacnes/>)(Meier, Boehler és mtsa. 2012). A vizsgált 123 izolátumot 37 különböző szekvencia típusba tudtuk besorolni, reprezentálva az akkor ismert négy filogenetiai csoportot (IA, IB, II, III). Összességében megállapítható, hogy a 7 génes MLST filogenetikai analízisre kiválóan alkalmazható, és egy stabil alapot biztosít további filogenetikai vizsgálatokhoz. Az MLST során nyert adatokból, az izolátumok közti filogenetikai kapcsolat feltérképezésére elsőként az UPGMA (Unweight Pair Group Method with Arithmetic Mean) agglomeratív módszert alkalmazták. Ez a módszer egy általános áttekintést ad az izolátumok hierarchikus elhelyezkedéséről, viszont az izolátumok leszármazásáról nem kapunk pontos képet (Feil, Li és mtsa. 2004). Az először *Enterococcus* fajokra alkalmazott MLSA (Multilocus-sequence analysis) analízis során, a többlókuszos szekvencia analízis lehetővé teszi a rekombinációs és mutációs események nyomon követését azonban a legközkedveltebb az allél profil analízis algoritmus, az eBURST (Naser, Thompson és mtsa. 2005). Így a populáció strukturájának és diverzitásának a meghatározására eBURST felvételeket készítettünk, amellyekkel az izolátumokat 2 klonális komplexbe (CC6, CC19), és négy csoportba soroltuk. Az eBURST populáció vizsgálata alapján elmondható, hogy a klonális komplexek jól reprezentálják az egyes betegségeket. Az IA típusba tartozó izolátumok

melyek 54%-a aknéből izolált, mind a CC6 klonális komplexbe térképeződött, míg a III-as filogenetika csoportba tartozó törzsek, melyeket csipő protézisekből izoláltak, a CC19 klonális komplexben helyezkednek el. Annak érdekében, hogy a filogenetikai osztályozás felbontását növeljük, a teljes genomok adatait felhasználva tovább finomítottuk a módszerünket, és kidolgoztuk az eMLST (expanded MLST) analízist. Ennek során a *recA* lókuszt kivettük és két, feltehetőleg virulencia gént, nevezetesen a hemolizint kódoló *tly*-t, és a CAMP faktor homológ *camp2*-t pedig bevontuk az analízisbe. Így maximalizálva a diszkriminációs lehetőséget az *aroE*, *atpD*, *gmk*, *guaA*, *lepA*, *sodA*, *tly* és a *camp2* gének szekvenciájának a felhasználásával hoztuk létre az eMLST módszert (<http://pubmlst.org/pacnes>) ami 6 filogenetikai csoportra osztja az izolátumokat: IA₁, IA₂, IB, IC, II, és III. Az eMLST tipizálási módszer lehetővé tette számunkra, hogy az eST-k alapján végrehajtott filogenetikai analízis segítségével az aknés és egészséges bőrről származó izolátumokat klonális komplexekbe soroljuk. Az eBURST alapján 285 izolátum felhasználásával 91 különböző eST-t azonosítottunk, melyeket 8 klonális komplexbe soroltunk. Megállapítottuk, hogy az aknés izolátumok - főként IA₁ típus - a CC1, a CC3 és a CC4 klonális komplexekbe tartoznak, míg az egészséges bőr izolátumai - az IB típus - a CC5, II-es típus a CC72 és a III-as típus a CC77 klonális komplexek tagjai. A humán mikrobiom projekt keretében számos *P. acnes* törzset izoláltak, már melyek genotipizálása folyamatosan zajlik (Fitz-Gibbon, Tomida és mtsa. 2013) (<http://hmpdacc.org>). Ennek a projektnek a keretében azonosított *P. acnes* izolátumokat felhasználva vetettük össze az eMLST-t az MLST9 analízissel (Lomholt és Kilian 2010; Kilian, Scholz és mtsa. 2012). Megállapítható, hogy az eMLST 33 szekvencia típust és 7 klonális komplexet különít el, szemben a 22 szekvencia típussal és 6 klonális komplex-el. Összegezve elmondható tehát, hogy az eMLST felbontóképessége nagyobb, szemben a MLST9 módszerrel, továbbá a klonális komplexekbe sorolt izolátumok jól reprezentálják a különböző betegségeket, így elkülöníthető a kommenzalista valamint a patogén *P. acnes* izolátum. Ez rendkívül fontos nemcsak a mikrobiológia diagnosztika számára, hanem a gazda-patogén kölcsönhatás molekuláris alapjainak a megismeréséhez is. Számos tanulmány bizonyította már, hogy különböző *P. acnes* izolátumok eltérő választ indukálnak az immunrendszer sejtjeiben és a keratinocitákban ((Pivarcsi, Nagy és mtsa. 2005; Akaza, Akamatsu és mtsa. 2009; Drott, Alexeyev és mtsa. 2010; Grange, Weill és mtsa. 2010). A törzsek genom szintű eltéréseinek kutatása 2004-től, az első teljes genom leközlésével egyre nagyobb teret nyert (Bruggemann, Henne és mtsa. 2004). Azonosítottak olyan extracelluláris és sejtfal-kötött enzimeket, melyek részt vesznek a gazdasejt degradációjában (hialuronát liáz, lipáz,) vagy

éppen a gazdasejthez történő adhézióban. Ezek mellett pl. olyan gén szigeteket találtak, melyek nem riboszómális peptid-szintetázt kódolnak, hozzájárulva a baktérium virulenciájának a növeléséhez, továbbá olyan mobilis genetikai elemeket, amelyek virulencia géneket kódolnak (Fitz-Gibbon, Tomida és mtsa. 2013; Tomida, Nguyen és mtsa. 2013). Így a további *P. acnes* törzsek közötti eltérések azonosításának az érdekében teljes genom szekvenálásokat végeztünk. Az izolátumok képviselik az eddigi összes ismert fő filogenetikai csoportot, így a lehetséges patogéneket: az IA₁, az IA₂ és az IC csoportot, és a feltehetőleg kommenzalista IB, II és III típust. A megszekvenált genomok összehasonlításának vizsgálatakor, virulencia faktorokat, antibiotikum rezisztenciáért és morfológiai változásért felelős géneket determináltunk. A III-as filogenetikai csoportba tartozó izolátumok egy atipikus elongálódott fenotípust mutatnak. Feltételezéseink szerint a GroEL chaperon fehérjében létrejövő mutáció felelős a megnyúlt sejttypusért, mivel az *E. Coli* GroEL chaperonjában létrejött mutáció is megnyúlt fenotípust eredményezett (Login, Balmand és mtsa. 2011). Transzmissziós elektronmikroszkópos (Dekio, Rajendram és mtsa. 2012) és az általunk készített pásztázó elektronmikroszkópos felvételek alapján is jól látható a különbség a törzsek között. Máig nem áll rendelkezésre adat ezen sejtek DNS tartalmáról és az elongálódott fenotípus háttéréről. Következésképpen, hogy kiderítsük valóban egy elongálódott sejtet detektáltunk, konfokális mikroszkóp felvételeket készítettünk. A felvételek alapján elmondható, hogy a baktérium kultúrában van hosszabb megnyúlt egysejt típus, továbbá olyan hosszú sejt, amit két rövidebb sejt alkot, így látható fényben egy sejtnek tűnik. Tovább vizsgálva a jelenséget a sejtek DNS tartalmát tanulmányoztuk FACS módszerrel. A sejtek mérete alapján történő elválasztása után a DNS festék intenzitásából következtettünk a sejtek DNS tartalmára (Darzynkiewicz és Huang 2001). A sejt kultúra vizsgálatakor két elhatárolódó populáció volt látható. A DNS festék intenzitásának az analízise alapján elmondható, hogy a nagyobb sejt méret tartományban elhelyezkedő sejtek DNS tartalma alig változik összehasonlítva a kisebb tartományban elhelyezkedő sejtekkel, így azok egy megnyúlt sejtnek tekinthetőek.

Az 1980-as években jelent meg elsőként a MALDI-TOF-alapú biomolekulák meghatározása azonban csak az elmúlt években került előtérbe a mikroorganizmusok azonosítására való használata. Nagy előnye, hogy viszonylag kevés mikrobiális biomassza elegendő az analízishez (10^4 - 10^6) így az inokulálás után már pár órával vizsgálható a minta. Ez alól kivételt jelent pl. vizeletminta patogén baktériumainak az azonosítása, ahol direkt analízisre is van lehetőség (Ferreira, Sánchez-Juanes és mtsa. 2011). Ellenben fontos a minta frissessége, ugyanis a riboszómális fehérjék tömegspektrumát analizálják, így a

tenyészet öregedésével egyenes arányban a fehérjék degradálódnak, így a faj azonosításának a hatékonysága csökken (Wieser, Schneider és mtsa. 2012). A mikrobiológiai diagnosztikában a MALDI-TOF jelentősége egyre növekszik, ugyanis mára már kiszorította a klasszikus biokémiai alapú fajsztípusú tipizálást. Ugyanakkor pl. *E. coli* vagy *Streptococcus pneumoniae* esetében, ahol a 16S rDNS nem különbözik eléggé, a csoportok között a MALDI-TOF nem tud különbséget tenni, így a klasszikus módszerek, esetükben még elengedhetetlenek (biokémiai teszt, antigén detektálás) (Wieser, Schneider és mtsa. 2012). A fajsztípusú azonosításon felül egyre nagyobb a törekvés az izolátumok törzssztípusú identifikációjára, amit a törzstre jellemző specifikus markerek felderítésével végeznek (Croxatto, Prod'hom és mtsa. 2012). Számos patogén baktérium szerotípusainak és törzssztípusú elkülönítéseire használták már, mint pl. az élelmiszer-eredetű patogén *Salmonella enterica*, a tularémiát okozó *Francisella tularensis*, vagy az agyhártyagyulladás okozó *Streptococcus agalactiae* esetében (Dieckmann és Malorny 2011; Lanotte és mtsa. 2013). Annak érdekében, hogy megbizonyosodjunk az általunk kidolgozott eMLST módszer pontosságáról, és további információt kapjunk a *P. acnes* interperszonális kolonizációjáról, MALDI-TOF MS analízist végeztünk el 61 *P. acnes* törzssztípuson. Az eMLST módszerrel először 13 izolátum genotípusát meghatároztuk, így a MALDI-TOF kísérleteinkben, mint referencia törzsek szerepelnek. A klinikai izolátumok gél-alapú vizsgálata alapján el tudtuk különíteni a fő filogenetikai típusokat (IA, IB, IC, II, III) amelyekkel kapcsolatban a fő spektrumokra a tenyésztési idő (24 óra, 48 óra) nem volt hatással. Összességében elmondható, hogy a felbontóképessége gyengébb a MPCR-nél és az eMLST-nél, viszont jobb a RAPD módszernél.

A klinikai izolátumok gyűjtése során egy úgynevezett törlést végeznek, majd egy szemi-szelektív táptalajon történik a *P. acnes* tenyésztése (Miura, Ishige és mtsa. 2010). A mintagyűjtési módszert mint kritikus tényezőt és az adatok értelmezése során mindenképpen figyelmbe kell venni, hogy hogyan történt. A törlés során egy átfogó képet kapunk a bőr felszínén és a stratum corneumban elhelyezkedő mikroorganizmusokról. További használatban lévő módszer a biopszia, amely során mélyen a folliculusban található mikroorganizmusokat vizsgálják. Ennél a módszernél viszont figyelembe kell venni a vizsgálandó terület folliculus denzitását, ugyanis ez testszerte változó. A biopszia minták felhasználásával a *P. acnes* azonosításának és lokalizációjának a vizsgálata bakteriális DNS festéssel, specifikus monoklonális antitesttel, vagy FISH (fluorescence *in situ* hybridization) módszerrel tanulmányozható (Amann és Fuchs 2008; Poppert, Riecker és mtsa. 2010). Azonban molekuláris azonosítási módszereket felhasználva kimutatták,

hogy lényegében a mikrobiális populációk összetétele nem mutat eltérést a két mintavételezési eljárás között (Grice, Kong és mtsa. 2008). Annak érdekében, hogy kiküszöböljük az ártalmatlan mikrobák patogénként történő beazonosítását, a mintavételezésen finomítottunk. A Nantesi Bőrclinika bőrgyógyászaival együttműködve aknés betegek különböző bőrfelületeiről gyűjtöttek izolátumokat a számunkra. Ezzel a mintavételezési eljárással közelebb juthatunk a *P. acnes* kolonizációs dinamikájának megismeréséhez, mind intra- mind interperszonálási szinten is. A hipotézisünket mely szerint, egy adott follikulust azonos filogenetikai csoportba, ezen felül azonos e-szekvencia típusba tartozó törzs kolonizál MPCR és eMLST módszerekkel vizsgálva bizonyítottuk. Az azonosított izolátumok többsége a patogénnek számító IA₁, IA₂ és IC típusba tartoztak, azonban néhány esetben előfordult IB típus is, ezek nagy valószínűséggel az egészséges területekről származó "szennyeződések".

A *P. acnes* oportunista patogén, természete végett elengedhetetlen, hogy olyan túlélési stratégiákat fejlesszen ki, amelyekkel a megváltozott környezethez adaptálódni tud, és képes a saját életterét növelni (Finlay és McFadden 2006). Elsődleges virulencia faktornak tekintjük a szekretált enzimeit, melyek a gazdasejtet és annak tartalmát képesek degradálni. Ilyen szekretált enzimek pl. a lipázok, a proteázok és a hialuronidázok (Hoeffler 1977). A *P. acnes* specifikus extracelluláris lipáz a GehA (glicerol-észter hidroláz A, PPA2105) egy olyan enzim, ami a szébum trigliceridjeit hidrolizálja szabad zsírsavakra és glicerolra (Miskin, Farrell és mtsa. 1997) amit a baktérium további energiaforrásként hasznosít. A felszabaduló zsírsavak irritáló hatásúak, elősegítik a sejtadhéziót és a follikulus kolonizációját (Gribbon, Cunliffe és mtsa. 1993; Stehr, Kretschmar és mtsa. 2003; Falcocchio, Ruiz és mtsa. 2006). A szébum túltermelődése során a baktérium számára egy kedvező mikrokozonyzet jön létre, így elősegítve a patogén baktérium kolonizációját, ezáltal növelve az esélyt az acne vulgaris kialakulásához. Annak érdekében, hogy kiderítsük a különböző baktériumok szébum hidrolízisében betöltött szerepét, lipáz aktivitás vizsgálatokat végeztünk, vékonyréteg kromatográfiás módszerrel. Az eredmények jól tükrözik, hogy a rendszerhez adott olívaolaj - megváltozott mikrokozonyzetet létrehozva - a különböző törzsekre eltérő hatást gyakorolt. Az olívaolaj gazdag olajsavban, ami leginkább meghatározó a humán szébumban. *In vitro* kísérletekben kimutatták, hogy az olajsavnak nincs potenciális baktericid hatása a *P. acnes*-re. (Nakatsuji, Kao és mtsa. 2010). Összességében elmondható, hogy a feltehetően patogén törzsek lipáz aktivitása minden esetben magasabb volt, összevetve a vélhetően kommenzalista törzsekével rámutatva, hogy a megnövekedett triglicerid hidrolízis

képesség összefügg a baktérium patogenitásával, és növelheti annak a virulenciáját. Eredményeink alátámasztják, hogy a bőrről izolált, különböző *P. acnes* biotípusok közül az egykor hármas biotípusként beazonosított törzsek rendelkeznek a legnagyobb lipáz aktivitással, ami megfelel az I-es filogenetikai típusnak (Cunliffe, Strangfeld és mtsa. 1975; Higaki, Kitagawa és mtsa. 2000; McDowell, Valanne és mtsa. 2005). Élő- és formalinban előlt *P.acnes* növeli a sebociták lipogenezisét és a trigliceridek szintézisét. Ezt igazolja, hogy az aknéban szenvedő betegek bőréről megnövekedett mennyiségű szabad zsírsavat izoláltak (Ito, Kitamura és mtsa. 1996; Inuma, Sato és mtsa. 2009). Az upregulálódott szabad zsírsavak megnövelik az antimikorbiális peptid (hBD2) expresszióját, ami hozzájárul a gazdasejt védelméhez. Azonban ezt a jelenséget csak kis szénatomszámú (C12) zsírsav esetén tapasztalták (Nakatsuji, Kao és mtsa. 2009). Ahhoz, hogy kiderítsük a baktérium virulenciájában a lipáznak mekkora szerepe van, nélkülözhetetlen egy hatékony génkiütési rendszer. A genetikai manipuláció a baktérium tulajdonságaiból adódóan nehéz feladat: magas GC tartalom, a restriktív-módosító rendszer (restriction modification system), amely védelmet nyújt a baktérium számára az idegen DNS felvétele ellen, természetes plazmid hiánya, ami megkönnyítené a transzformációt és kevés hatékony szelekciós marker létezik, ami alkalmazható a genetikai manipuláció során (Bruggemann, 2012). Egyetlen elérhető *P. acnes* mutagenézis stratégiát felhasználva terveztük meg a rezisztencia gén inszerciója nélküli genetikai manipuláció stratégiánkat a *gehA* lipáz kiütésére (Sörensen, Mak és mtsa. 2010). A módszer alapjául azok a target géntől up- és downstream elhelyezkedő régiók szolgálnak amik adeléciós kazetta két elemét alkotva, lehetővé teszik a kettős homolog rekombinációt. Alapvető, hogy a két régió mérete ne különbözzön így a rekombináció valószínűsége azonos lesz az up- és downstream oldalakon. A klónozó plazmid sejtbe juttatása a fent említett okok miatt rendkívül körülményes és a már optimalizált elektroporáció hatékonysága is elég alacsony (Cheong, Lee és mtsa. 2008). Éppen ezért vektorunkat protoplaszt képzéssel juttattuk be a sejtbe, majd a pozitív klónt replikáztuk antibiotikumos és antibiotikum-mentes táptalajra (Schafer, Tauch és mtsa. 1994). A replikálás után az antibiotikum rezisztenciát elvesztő klónon ellenőrző PCR-t, és a lipáz aktivitásának a mérését végeztük el. A kísérlet alapján elmondható, hogy a mutáns törzsünk lipáz aktivitása harmad részére csökkent összehasonlítva a vad típusal. Az így előállított mutáns a további kísérleteinkhez meghatározó jelentőségű, mivel nélkülözhetetlen bizonyítékot szolgáltat ahhoz a hipotézisünkhöz, hogy az acne vulgaris kialakulása során a bakteriális kolonizáció nem egy

másodlagos esemény és a környezeti feltételek (megnövekedett faggyúszekréció a folliculusban) igen fontosak a patomechanizmus során.

6. ÖSSZEFOGLALÓ

Bőrünkön, szervezetünk első védelmi vonalán nemcsak kommenzalista hanem patogén formában is előforduló *P. acnes* egy Gram-pozitív, korineform, nem spórázó, anaerob, opportunista baktérium, amelyet számos kórkép megjelenésével hoztak összefüggésbe. Leggyakrabban az acne vulgaris kialakításában játszik szerepet, amely multifaktoriális eredetű betegség, és a pilosebaceous follikulusok krónikus gyulladása jellemzi. Elsősorban a serdülőkorúak és fiatal felnőttek körében elterjedt jellegzetesen a sok faggyútermelő miriggyel rendelkező bőrfelületeken, mint pl. az arc, nyak, mellkas, hát vagy váll. A kórkép patogenezise valamint a *P. acnes* pontos szerepe azonban még nem teljesen ismert.

Munkánk során olyan módszereket - pl. touchdown multiplex PCR és eMLST - dolgoztunk ki, amelyekkel a *P. acnes* különböző izolátumai gyorsan, hatékonyan és megbízható módon azonosíthatóak és osztályozhatóak. Ekképpen nem csak a mikrobiológiai diagnosztika számára, hanem az egyénre szabott terápiának a kidolgozásához is nélkülözhetetlen segítséget nyújtanak.

Az eBURST eredményei és az eMLST tipizálási módszer lehetővé tette számunkra, hogy az eST-k alapján végrehajtott filogenetikai analízis segítségével az aknés és egészséges bőrről származó izolátumokat klonális komplexekbe soroljuk. Megállapítottuk, hogy az aknés izolátumok főként IA1 típus CC1, CC3 és CC4 klonális komplexekbe tartoznak, míg az érintetlen bőr izolátumai az IB típus CC5, II-es típus CC72 és III-as típus CC77 klonális komplexek tagjai.

A törzsek filogenetikai csoportokba és szekvencia típusokba való bontása segítségével tehát elkülöníthetőek a kommenzalista, valamint a patogén *P. acnes* izolátumok, amelyek teljes genomszekvenciáinak összehasonlításával számos különbséget azonosítottunk: ezek potenciálisan a morfológiai különbségekért, a patogenitásért, az antibiotikum-rezisztenciáért, illetve a virulenciáért felelős faktorok.

A teljes genom szekvenálási adatokat felhasználva a III-as filogenetikai típus atipikus fenotípusának a genetikai hátterét megvizsgáltuk, és egy feltehetően chaperon fehérjében felfedezett mutációt azonosítottunk. Tovább vizsgálva ezt a fenotípus változást mikroszkópos és FACS felvételeket készítettünk, ami alapján elmondható, hogy a megnyúlt sejtek egy sejtnek tekinthetőek.

MALDI-TOF MS analízist végeztünk el 61 klinikai *P. acnes* izolátumon, amellyel közelebb juthatunk az egyént kolonizáló patogén törzsek gyakoriságának a

megismeréséhez. Továbbá, az analízis során nyert adatok segítséget nyújthatnak az automatizált mikrobiológiai diagnosztika számára.

Az általunk kifejlesztett munkafolyamat - follikulus-specifikus mintavétel, majd a kitenyésztett törzsek multiplex PCR-es valamint eMLST-s jellemzése - immáron nagy megbízhatósággal állapítja meg az adott egyént kolonizáló *P. acnes* genotípusát, mellyel információt kaphatunk a kolonizáló törzs patogenitásáról.

Az acne vulgaris kialakulásában potenciális patogén faktor a faggyú túlermelődése. A megtermelődött szébum gazdag lipidekben így az itt élő baktériumok-, mint a *P. acnes* számára kiváló energiaforrás. Reprezentálva az összes filogenetikai csoportot, a törzsek zsírsav hidrolízisét vékonyréteg kromatográfiás kísérletekkel vizsgáltuk. A kísérlet során bebizonyosodott, hogy a potenciálisan patogén törzseknek nagyobb hidrolitikus aktivitása van, így feltehetőleg szerepe van a baktérium virulenciájának a növelésében.

Ahhoz, hogy a *P. acnes*-gazda patomechanizmusának a molekuláris folyamatait jobban megismerjük, elengedhetetlen egy hatékony genetikai manipulációs rendszer. Munkánk során megterveztünk egy antibiotikum rezisztencia gén inszerciója nélküli gén deléciós mutagenézis stratégiát, melyet a *gehA* gén deléciójára alkalmaztunk. Az előállított mutáns lipáz aktivitását megvizsgálva elmondható, hogy az aktivitása két harmad részre csökkent összehasonlítva a vad típusú törzssel. Az általunk kidolgozott stratégia a jövőben felhasználható potenciális virulencia faktorok vizsgálatához.

7. SUMMARY

P. acnes, a Gram-positive, coryneform, non-spore-forming, anaerobic, opportunistic bacterium, that is present on our organism's first line of defence, the skin, not only as a commensalist, but also as a pathogen, has been correlated with several clinical pictures. Most often it plays a role in acne vulgaris, a multifactorial disease characterized by the chronic inflammation of pilosebaceous follicles. It is primarily prevalent in teenagers and young adults, typically on skin surfaces with many sebaceous glands, e. g. on the face, neck, chest, back and shoulders. The pathogenesis of this clinical picture and the exact role of *P. acnes* in it is not completely known yet.

In the course of this project we devised methods, e. g. touchdown multiplex PCR and eMLST, that allowed us fast, efficient and reliable identification and classification of various *P. acnes* isolates. Therefore these methods provide indispensable help not only for microbiological diagnostics, but also for the design of personalized therapy.

Results derived from eBURST and the eMLST typing method allowed us to classify isolates originating from healthy skin and diseased skin into clonal complexes, using phylogenetic analysis based on eSTs. We determined that isolates from diseased skin mainly belong to type IA₁ CC1, CC3 and CC4 clonal complexes, while isolates from healthy skin belong to type IB CC5, type II CC72 and type III CC77 clonal complexes.

The division of strains into phylogenetic groups and sequence types enables us to distinguish between commensalistic and pathogenic *P. acnes* isolates. By comparing whole genom sequences from these isolates, we identified many differences: these factors are potentially responsible for morphological differences, pathogenicity, antibiotic resistance and virulence.

Using data derived from whole genom sequencing, we examined the genetic background of the atypical phenotype of phylogenetic type III, and we identified a mutation, presumably in a chaperone protein. For further evaluation of this phenotypic change, microscope and FACS images were taken, based on which it can be established that the elongated cells are single cells.

A MALDI-TOF MS analysis was completed on 61 *P. acnes* clinical isolates, which may bring us closer to revealing the prevalence of pathogenic strains colonizing an individual. Furthermore, data derived from the analysis could aid in automated microbiological diagnostics.

The workflow we designed - follicle-specific sampling, the characterization of cultivated strains by multiplex PCR and eMLST - identifies the genotype of *P. acnes* colonizing an individual with great certainty, which provides us with information about the colonizing strain's pathogenicity.

A potential pathogenic factor in the development of acne vulgaris is the overproduction of sebum. The produced sebum is rich in lipids and fatty acids, serving as an excellent energy source for bacteria such as *P. acnes* that inhabit the skin. Representative of all of the phylogenetic groups, we investigated the hydrolysis of fatty acids by these strains using thin layer chromatography. In the course of the experiment it was proven that potentially pathogenic strains exhibit higher hydrolytic activity, so they probably play a role in increasing the virulence of the bacterium.

In order to further explore the molecular background of the *P. acnes*-host pathomechanism, an efficient system for genetic manipulation is essential. In the course of this project, we designed a strategy for gene deletion mutagenesis without the insertion of an antibiotic resistance gene, and applied this method for the deletion of the *gehA* gene. After the evaluation of the lipase activity in the produced mutant, it can be established that the activity has been reduced to two thirds compared to the activity of the wild type strain. The strategy devised hereby could be used for the analysis of potential virulence factors in the future.

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném megköszönni témavezetőmnek Dr. Nagy Istvánnak, hogy lehetőséget adott, hogy kutatócsoportjában elsajátítsam a mikrobiológiai és molekuláris biológiai technikákat és ismereteket! Hálás vagyok, hogy tanácsaival önálló kutatómunkára tanított! Köszönöm az áldozatos munkáját, mindenre kitejedő nélkülözhetetlen segítségét és türelmét!

Köszönöm Dr. Kondorosi Évának, az MTA SZBK Biokémiai Intézet Genomikai Egység vezetőjének, hogy lehetővé tette számomra a kutatótevékenységében való részvételt!

Hálásan köszönöm Vörös Andreának a kísérletekben és a mindennapok nehézségeinek a leküzdésében nyújtott segítségét a rendkívüli türelmét és a barátságát!

Mélységes hálával tartozom Karácsony Zoltánnak a szakmai tanácsaiért a kísérleteimben nyújtott segítségéért és feltétel nélküli barátságáért!

Köszönöm Radvánszkyné Mikuláss Katának a mikorszkópos munkákban nyújtott segítségét!

Köszönöm a segítségét a volt Baygen intézet valamennyi dolgozójának!

Köszönöm Dr. Andrew McDowell-nek (Nagy-Britannia, Belfast) a multiplex PCR és az eMLST módszerek kifejlesztésében nyújtott segítségét, Dr. Brigitte Dreno-nak (Franciaország, Nantes) valamint Dr. Urbán Editnek (Klinikai Mikrobiológia, Szeged) a klinikai mintavételezést!

Köszönöm a családomnak a támogatásukat és biztatásukat!

9. IRODALMI HIVATKOZÁSOK

1. Ahn, C. Y., C. Y. Ko, és mtsa. (1996). *Microbial evaluation: 139 implants removed from symptomatic patients*. Plastic and Reconstructive Surgery 98(7): 1225-1229.
2. Akaza, N., H. Akamatsu, és mtsa. (2009). *Effects of Propionibacterium acnes on various mRNA expression levels in normal human epidermal keratinocytes in vitro*. The Journal of Dermatology 36(4): 213-223.
3. Amann, R. és B. M. Fuchs (2008). *Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence in situ hybridization techniques*. Nature Reviews Microbiology 6(5): 339-348.
4. Anderson, T. P., A. M. Werno, és mtsa. (2013). *Comparison of four multiplex PCR assays for the detection of viral pathogens in respiratory specimens*. Journal of Virological Methods 191(2): 118-121.
5. Andrzej Kaszuba , R. B., Aleksandra Kaszuba (2006). *Adjunct and relating to a procedure methods of the management of acne vulgaris and traces after treatment (II)*. Aesthetic Dermatology 2: 37-43.
6. Beylot, C., N. Auffret, és mtsa. (2013). *Propionibacterium acnes: an update on its role in the pathogenesis of acne*. Journal of the European Academy Dermatology and Venereology.
7. Black, K. E., S. L. Collins, és mtsa. (2013). *Hyaluronan fragments induce IFN β via a novel TLR4-TRIF-TBK1-IRF3-dependent pathway*. Journal of Inflammation (Lond) 10(1): 23.
8. Bojar, R. A. és K. T. Holland (2004). *Acne and Propionibacterium acnes*. Clinics in Dermatology 22(5): 375-379.
9. Brenner, M. és V. J. Hearing (2008). *The protective role of melanin against UV damage in human skin*. Photochemical and Photobiological Science 84(3): 539-549.
10. Brüggemann, H., A. Henne, és mtsa. (2004). *The complete genome sequence of Propionibacterium acnes, a commensal of human skin*. Science 305(5684): 671-673.
11. Brüggemann, H., H. B. Lomholt, és mtsa. (2012). *The flexible gene pool of Propionibacterium acnes*. Mobile genetic elements 2(3): 145-148.
12. Cassinotti, P. és G. Siegl (1998). *A nested-PCR assay for the simultaneous amplification of HSV-1, HSV-2, and HCMV genomes in patients with presumed herpetic CNS infections*. Journal of Virological Methods 71(1): 105-114.
13. Cay M. Kielty, M. J. S. a. C. A. S. (2002). *Elastic fibers*. Journal of Cell Science 115: 2817-2828.

14. Chamberlain, J. S., R. A. Gibbs, és mtsa. (1988). *Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification*. Nucleic Acids Research 16(23): 11141-11156.
15. Chambers, H. F. és F. R. Deleo (2009). *Waves of resistance: Staphylococcus aureus in the antibiotic era*. Nature Reviews Microbiology 7(9): 629-641.
16. Chantalat J., T. C., Thomas J. Stephens, Amy S. Pappert (2007). *Salicylic acid microgel complex provides significant acne benefits in foaming cleanser formulations*. Journal of the American Academy of Dermatology 56(2, Supplement 2): AB24.
17. Chapman, E., G. W. Farr, és mtsa. (2006). *Global aggregation of newly translated proteins in an Escherichia coli strain deficient of the chaperonin GroEL*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 103(43): 15800-15805.
18. Cheong, D.-E., H.-I. Lee, és mtsa. (2008). *Optimization of electrotransformation conditions for Propionibacterium acnes*. Journal of Microbiological Methods 72(1): 38-41.
19. Choudhury, T. (1978). *Synergistic lysis of erythrocytes by Propionibacterium acnes*. Journal of Clinical Microbiology 8(2): 238-241.
20. Clark, W. L., P. K. Kaiser, és mtsa. (1999). *Treatment strategies and visual acuity outcomes in chronic postoperative Propionibacterium acnes endophthalmitis*. Ophthalmology 106(9): 1665-1670.
21. Cohen, R. J., B. A. Shannon, és mtsa. (2005). *Propionibacterium acnes associated with inflammation in radical prostatectomy specimens: a possible link to cancer evolution?* Journal of Urology 173(6): 1969-1974.
22. Costello, E. K., C. L. Lauber, és mtsa. (2009). *Bacterial community variation in human body habitats across space and time*. Science 326(5960): 1694-1697.
23. Coton, E. és M. Coton (2005). *Multiplex PCR for colony direct detection of Gram-positive histamine- and tyramine-producing bacteria*. Journal of Microbiological Methods 63(3): 296-304.
24. Croxatto, A., G. Prod'hom, és mtsa. (2012). *Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology*. FEMS Microbiology Reviews 36(2): 380-407.
25. Cunliffe, W., K. Strangfeld, és mtsa. (1975). *Lipolytic activity of microorganisms in acne vulgaris*. Proceedings of the Royal Society of Medicine 68(5): 275.
26. Darzynkiewicz, Z. és X. Huang (2001). *Analysis of Cellular DNA Content by Flow Cytometry*. Current Protocols in Immunology.
27. Davis, E. C. és V. D. Callender (2010). *Postinflammatory hyperpigmentation: a review of the epidemiology, clinical features, and treatment options in skin of color*. Journal of Clinical Aesthetic Dermatology 3(7): 20-31.

28. Debelian, G. J., I. Olsen, és mtsa. (1992). *Profiling of Propionibacterium acnes recovered from root canal and blood during and after endodontic treatment*. Endodontics Dental Traumatology Journal 8(6): 248-254.
29. Dekio, I., D. Rajendram, és mtsa. (2012). *Genetic diversity of Propionibacterium acnes strains isolated from human skin in Japan and comparison with their distribution in Europe*. Journal of Medical Microbiology 61(Pt 5): 622-630.
30. Delahaye, F., S. Fol, és mtsa. (2005). *[Propionibacterium acnes infective endocarditis. Study of 11 cases and review of literature]*. Archives des Maladies du Coeur et des Vaisseaux 98(12): 1212-1218.
31. Dieckmann, R. és B. Malorny (2011). *Rapid Screening of Epidemiologically Important Salmonella enterica subsp. enterica Serovars by Whole-Cell Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry*. Applied and Environmental Microbiology 77(12): 4136-4146.
32. Douglas, H. C. és S. E. Gunter (1946). *The Taxonomic Position of Corynebacterium acnes*. Journal of Bacteriol 52(1): 15-23.
33. Dreno, B., P. Foulc, és mtsa. (2005). *Effect of zinc gluconate on propionibacterium acnes resistance to erythromycin in patients with inflammatory acne: in vitro and in vivo study*. European Journal of Dermatology 15(3): 152-155.
34. Drott, J., O. Alexeyev, és mtsa. (2010). *Propionibacterium acnes infection induces upregulation of inflammatory genes and cytokine secretion in prostate epithelial cells*. BMC Microbiology 10(1): 126.
35. Eishi, Y., M. Suga, és mtsa. (2002). *Quantitative analysis of mycobacterial and propionibacterial DNA in lymph nodes of Japanese and European patients with sarcoidosis*. Journal of Clinical Microbiology 40(1): 198-204.
36. Enright, M. C., N. P. Day, és mtsa. (2000). *Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of Staphylococcus aureus*. Journal of Clinical Microbiology 38(3): 1008-1015.
37. Evans, C. A., W. M. Smith, és mtsa. (1950). *Bacterial flora of the normal human skin*. Journal of Investigative Dermatology 15(4): 305-324.
38. Falcocchio, S., C. Ruiz, és mtsa. (2006). *Propionibacterium acnes GehA lipase, an enzyme involved in acne development, can be successfully inhibited by defined natural substances*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 40(3): 132-137.
39. Feil, E. J., B. C. Li, és mtsa. (2004). *eBURST: Inferring Patterns of Evolutionary Descent among Clusters of Related Bacterial Genotypes from Multilocus Sequence Typing Data*. Journal of Bacteriology 186(5): 1518-1530.
40. Ferreira, L., F. Sánchez-Juanes, és mtsa. (2011). *Rapid method for direct identification of bacteria in urine and blood culture samples by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: intact cell vs. extraction method*. Clinical Microbiology and Infection 17(7): 1007-1012.

41. Finlay, B. B. és G. McFadden (2006). *Anti-Immunology: Evasion of the Host Immune System by Bacterial and Viral Pathogens*. Cell 124(4): 767-782.
42. Fitz-Gibbon, S., S. Tomida, és mtsa. (2013). *Propionibacterium acnes strain populations in the human skin microbiome associated with acne*. Journal of Investigative Dermatology.
43. Fujimura, S. és T. Nakamura (1978). *Purification and properties of a bacteriocin-like substance (acnecin) of oral Propionibacterium acnes*. Antimicrobial Agents Chemotherapy 14(6): 893-898.
44. Funke, G., A. von Graevenitz, és mtsa. (1997). *Clinical microbiology of coryneform bacteria*. Clinical Microbiology Reviews 10(1): 125-159.
45. Grange, P. A., B. Weill, és mtsa. (2010). *Does inflammatory acne result from imbalance in the keratinocyte innate immune response?* Microbes and Infection 12(14): 1085-1090.
46. Gribbon, E., W. Cunliffe, és mtsa. (1993). *Interaction of Propionibacterium acnes with skin lipids in vitro*. Journal of General Microbiology 139(8): 1745-1751.
47. Grice, E. A., H. H. Kong, és mtsa. (2009). *Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome*. Science 324(5931): 1190-1192.
48. Grice, E. A., H. H. Kong, és mtsa. (2008). *A diversity profile of the human skin microbiota*. Genome Research 18(7): 1043-1050.
49. Grice, E. A. és J. A. Segre (2011). *The skin microbiome*. Nature Reviews Microbiology 9(4): 244-253.
50. Haider, A. és J. C. Shaw (2004). *Treatment of acne vulgaris*. The Journal of the American Medical Association 292(6): 726-735.
51. Higaki, S., T. Kitagawa, és mtsa. (2000). *Correlation between Propionibacterium acnes biotypes, lipase activity and rash degree in acne patients*. The Journal of Dermatology 27(8): 519.
52. Hoeffler, U. (1977). *Enzymatic and hemolytic properties of Propionibacterium acnes and related bacteria*. Journal of Clinical Microbiology 6(6): 555-558.
53. Horvath, B., J. Hunyadkurti, és mtsa. (2012). *Genome sequence of Propionibacterium acnes type II strain ATCC 11828*. Journal of Bacteriology 194(1): 202-203.
54. Hunyadkurti, J., Z. Feltoti, és mtsa. (2011). *Complete genome sequence of Propionibacterium acnes type IB strain 6609*. Journal of Bacteriology 193(17): 4561-4562.
55. Huson, D. H. és D. Bryant (2006). *Application of phylogenetic networks in evolutionary studies*. Molecular Biology and Evolution 23(2): 254-267.

-
56. Hykin, P. G., K. Tobal, és mtsa. (1994). *The diagnosis of delayed post-operative endophthalmitis by polymerase chain reaction of bacterial DNA in vitreous samples*. Journal of Medical Microbiology 40(6): 408-415.
 57. HYwel C Williams, R. P. D., Sarah Garner (2012). *Acne vulgaris*. The Lancet 379: 361-372.
 58. Iinuma, K., T. Sato, és mtsa. (2009). *Involvement of Propionibacterium acnes in the augmentation of lipogenesis in hamster sebaceous glands in vivo and in vitro*. Journal of Investigative Dermatology 129(9): 2113-2119.
 59. Ito, A., K. Kitamura, és mtsa. (1996). *A novel enzymatic assay for the quantification of skin surface lipids*. Journal of International Medical Research 24(1): 69-83.
 60. Jacks, T. J. és H. W. Kircher (1967). *Fluorometric assay for the hydrolytic activity of lipase using fatty acyl esters of 4-methylumbelliferone*. Analytical Biochemistry 21(2): 279-285.
 61. Jappe, U. (2003). *Pathological mechanisms of acne with special emphasis on Propionibacterium acnes and related therapy*. Acta Dermatologica-Venereologica 83(4): 241-248.
 62. Johnson, J. L. és C. S. Cummins (1972). *Cell wall composition and deoxyribonucleic acid similarities among the anaerobic coryneforms, classical propionibacteria, and strains of Arachnia propionica*. Journal of Bacteriology 109(3): 1047-1066.
 63. Kanitakis, J. (2002). *Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin*. European Journal of Dermatology 12(4): 390-399.
 64. Kilian, M., C. F. P. Scholz, és mtsa. (2012). *Multilocus Sequence Typing and Phylogenetic Analysis of Propionibacterium acnes*. Journal of Clinical Microbiology 50(4): 1158-1165.
 65. Kishishita, M., T. Ushijima, és mtsa. (1979). *Biotyping of Propionibacterium acnes isolated from normal human facial skin*. Applied and Environmental Microbiology 38(4): 585-589.
 66. Kolarsick, P. A., M. A. Kolarsick, és mtsa. (2011). *Anatomy and Physiology of the Skin*. Journal of the Dermatology Nurses' Association 3: 203-213.
 67. Krause, K., A. Schnitger, és mtsa. (2007). *Corticotropin-releasing hormone skin signaling is receptor-mediated and is predominant in the sebaceous glands*. Hormone and Metabolic Research 39(2): 166-170.
 68. Krowchuk, D. P. (2000). *Treating acne: a practical guide*. Medical Clinics of North America 84(4): 811-828.
 69. Kunishima, S., C. Inoue, és mtsa. (2001). *Presence of Propionibacterium acnes in blood components*. Transfusion 41(9): 1126-1129.

-
70. Lang, S. és M. Palmer (2003). *Characterization of Streptococcus agalactiae CAMP factor as a pore-forming toxin*. Journal of Biological Chemistry 278(40): 38167-38173.
 71. Lanotte, P., M. Perivier, és mtsa. (2013). *Proteomic biomarkers associated with Streptococcus agalactiae invasive genogroups*. PLoS One 8(1): 23.
 72. Lartigue, M.-F., G. Héry-Arnaud, és mtsa. (2009). *Identification of Streptococcus agalactiae Isolates from Various Phylogenetic Lineages by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry*. Journal of Clinical Microbiology 47(7): 2284-2287.
 73. Leeming, J. P., K. T. Holland, és mtsa. (1988). *The microbial colonization of inflamed acne vulgaris lesions*. British Journal of Dermatol 118(2): 203-208.
 74. Leyden, J. J. (2003). *A review of the use of combination therapies for the treatment of acne vulgaris*. Journal of the American Academy of Dermatology 49(3): S200-S210.
 75. Leyden, J. J., K. J. McGinley, és mtsa. (1975). *Propionibacterium levels in patients with and without acne vulgaris*. Journal of Investigative Dermatology 65(4): 382-384.
 76. Leyden JJ, W. M., Baldwin EK (2008). *Antibiotic-resistant Propionibacterium acnes suppressed by a benzoyl peroxide cleanser 6%*. Cutis Journal 82(6): 417-421.
 77. Liu, B., X. Zhou, és mtsa. (2012). *Development of a novel multiplex PCR assay for the identification of Salmonella enterica Typhimurium and Enteritidis*. Food Control 27(1): 87-93.
 78. Lodes, M. J., H. Secrist, és mtsa. (2006). *Variable expression of immunoreactive surface proteins of Propionibacterium acnes*. Microbiology 152(Pt 12): 3667-3681.
 79. Login, F. H., S. Balmand, és mtsa. (2011). *Antimicrobial peptides keep insect endosymbionts under control*. Science 334(6054): 362-365.
 80. Lomholt, H. B. és M. Kilian (2010). *Population genetic analysis of Propionibacterium acnes identifies a subpopulation and epidemic clones associated with acne*. PLoS One 5(8): e12277.
 81. Lookingbill, D. P., D. K. Chalker, és mtsa. (1997). *Treatment of acne with a combination clindamycin/benzoyl peroxide gel compared with clindamycin gel, benzoyl peroxide gel and vehicle gel: combined results of two double-blind investigations*. Journal of the American Academy of Dermatology 37(4): 590-595.
 82. Maiden, M. C. J., J. A. Bygraves, és mtsa. (1998). *Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms*. Proceedings of the National Academy of Sciences 95(6): 3140-3145.

83. Matte-Tailliez, O., E. Lepage, és mtsa. (2002). *Use of predictive modeling for Propionibacterium strain classification*. Systematic and Applied Microbiology 25(3): 386-395.
84. McDowell, A., E. Barnard, és mtsa. (2012). *An expanded multilocus sequence typing scheme for propionibacterium acnes: investigation of 'pathogenic', 'commensal' and antibiotic resistant strains*. PLoS One 7(7): e41480.
85. McDowell, A., A. Gao, és mtsa. (2011). *A novel multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen Propionibacterium acnes and characterization of type I cell surface-associated antigens*. Microbiology 157(Pt 7): 1990-2003.
86. McDowell, A., J. Hunyadkürti, és mtsa. (2012). *Draft genome sequence of an antibiotic-resistant Propionibacterium acnes strain, PRP-38, from the novel type IC cluster*. Journal of Bacteriology 194(12): 3260-3261.
87. McDowell, A., A. L. Perry, és mtsa. (2008). *A new phylogenetic group of Propionibacterium acnes*. Journal of Medical Microbiology 57(Pt 2): 218-224.
88. McDowell, A., S. Valanne, és mtsa. (2005). *Propionibacterium acnes Types I and II Represent Phylogenetically Distinct Groups*. Journal of Clinical Microbiology 43(1): 326-334.
89. Meier, A. H., M. L. Boehler, és mtsa. (2012). *A surgical simulation curriculum for senior medical students based on TeamSTEPPS*. Archive of Surgery 147(8): 761-766.
90. Miragaia, M., J. C. Thomas, és mtsa. (2007). *Inferring a population structure for Staphylococcus epidermidis from multilocus sequence typing data*. Journal of Bacteriol 189(6): 2540-2552.
91. Miskin, J. E., A. M. Farrell, és mtsa. (1997). *Propionibacterium acnes, a resident of lipid-rich human skin, produces a 33 kDa extracellular lipase encoded by gehA*. Microbiology 143(5): 1745-1755.
92. Miura, Y., I. Ishige, és mtsa. (2010). *Quantitative PCR of Propionibacterium acnes DNA in samples aspirated from sebaceous follicles on the normal skin of subjects with or without acne*. Journal of Medical and Dental Sciences 57(1): 65-74.
93. Moll, I. (1994). *Merkel cell distribution in human hair follicles of the fetal and adult scalp*. Cell and Tissue Research 277(1): 131-138.
94. Nagy, E., T. Maier, és mtsa. (2009). *Species identification of clinical isolates of Bacteroides by matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*. Clinical Microbiology and Infection 15(8): 796-802.
95. Nagy, I. és L. Kemeny (2007). *Defining the role of epidermal cells in the pathogenesis of inflammatory acne*. Current Trends in Immunology 8: 1-9.
96. Nagy, I., A. Pivarcsi, és mtsa. (2006). *Propionibacterium acnes and lipopolysaccharide induce the expression of antimicrobial peptides and*

- proinflammatory cytokines/chemokines in human sebocytes*. *Microbes and Infection* 8(8): 2195-2205.
97. Nagy, I., A. Pivarcsi, és mtsa. (2005). *Distinct strains of Propionibacterium acnes induce selective human beta-defensin-2 and interleukin-8 expression in human keratinocytes through toll-like receptors*. *Journal of Investigative Dermatology* 124(5): 931-938.
 98. Nakatsuji, T., M. C. Kao, és mtsa. (2009). *Sebum free fatty acids enhance the innate immune defense of human sebocytes by upregulating β -defensin-2 expression*. *Journal of Investigative Dermatology* 130(4): 985-994.
 99. Nakatsuji, T., M. C. Kao, és mtsa. (2010). *Sebum Free Fatty Acids Enhance the Innate Immune Defense of Human Sebocytes by Upregulating beta-Defensin-2 Expression*. *Journal of Investigative Dermatology* 130(4): 985-994.
 100. Nakatsuji, T., Y. T. Liu, és mtsa. (2008). *Vaccination targeting a surface sialidase of P. acnes: implication for new treatment of acne vulgaris*. *PLoS One* 3(2): e1551.
 101. Naser, S. M., F. L. Thompson, és mtsa. (2005). *Application of multilocus sequence analysis (MLSA) for rapid identification of Enterococcus species based on rpoA and pheS genes*. *Microbiology* 151(7): 2141-2150.
 102. Niazi, S. A., D. Clarke, és mtsa. (2010). *Propionibacterium acnes and Staphylococcus epidermidis isolated from refractory endodontic lesions are opportunistic pathogens*. *Journal of Clinical Microbiology* 48(11): 3859-3869.
 103. Niyonsaba, F., H. Ogawa, és mtsa. (2004). *Human beta-defensin-2 functions as a chemotactic agent for tumour necrosis factor-alpha-treated human neutrophils*. *Immunology* 111(3): 273-281.
 104. Oprica, C., S. Löfmark, és mtsa. (2005). *Genetic basis of resistance in Propionibacterium acnes strains isolated from diverse types of infection in different European countries*. *Anaerobe* 11(3): 137-143.
 105. Perry, A. L., T. Worthington, és mtsa. (2003). *Analysis of clinical isolates of Propionibacterium acnes by optimised RAPD*. *FEMS Microbiology Letters* 228(1): 51-55.
 106. Pivarcsi, A., I. Nagy, és mtsa. (2005). *Innate Immunity in the Skin: How Keratinocytes Fight Against Pathogens*. *Current Trends in Immunology I*: 29-42.
 107. Poppert, S., M. Riecker, és mtsa. (2010). *Rapid identification of Propionibacterium acnes from blood cultures by fluorescence in situ hybridization*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 66(2): 214-216.
 108. Prevost, N. és J. C. English Iii (2013). *Isotretinoin: Update on Controversial Issues*. *Journal of Pediatric and Adolescent Gynecology* 26(5): 290-293.
 109. Raftis, E. J., E. Salvetti, és mtsa. (2011). *Genomic diversity of Lactobacillus salivarius*. *Applied and Environmental Microbiology* 77(3): 954-965.

110. Rebecca Nguyen, J. S. (2010). *Treatment of acne vulgaris*. *Pediatrics and Child Health* 21(3): 119-125.
111. Rico, M. J. (2013). *The role of inflammation in acne vulgaris*. *Practical Dermatology* 8: 22-33.
112. Riedel, K. H., B. D. Wingfield, és mtsa. (1998). *Identification of classical Propionibacterium species using 16S rDNA-restriction fragment length polymorphisms*. *Systematic and Applied Microbiology* 21(3): 419-428.
113. Ronti, T., G. Lupattelli, és mtsa. (2006). *The endocrine function of adipose tissue: an update*. *Clinical Endocrinology (Oxf)* 64(4): 355-365.
114. Ross, J. I., E. A. Eady, és mtsa. (1998). *16S rRNA mutation associated with tetracycline resistance in a gram-positive bacterium*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 42(7): 1702-1705.
115. Sabatini, D. D., K. Bensch, és mtsa. (1963). *Cytochemistry and electron microscopy. The preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation*. *Journal of Cell Biology* 17: 19-58.
116. Sakamoto, F. H., J. D. Lopes, és mtsa. (2010). *Photodynamic therapy for acne vulgaris: a critical review from basics to clinical practice: part I. Acne vulgaris: when and why consider photodynamic therapy?* *Journal of American Academy of Dermatology* 63(2): 183-193; quiz 193-184.
117. Sambrook, J. és R. D. William (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Lab Press.
118. Sampedro, M. F., K. E. Piper, és mtsa. (2009). *Species of Propionibacterium and Propionibacterium acnes phylotypes associated with orthopedic implants*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 64(2): 138-145.
119. Saxena, R., J. ISAR, és mtsa. (2005). *Efficient microwave-assisted hydrolysis of triolein and synthesis of bioester, bio-surfactant and glycerides using Aspergillus carneus lipase*. *Current Science* 89(6): 1000-1003.
120. Schaefferbeke, T., L. Lequen, és mtsa. (1998). *Propionibacterium acnes isolated from synovial tissue and fluid in a patient with oligoarthritis associated with acne and pustulosis*. *Arthritis and Rheumatology* 41(10): 1889-1893.
121. Schafer, A., A. Tauch, és mtsa. (1994). *Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the Escherichia coli plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of Corynebacterium glutamicum*. *Gene* 145(1): 69-73.
122. Shu, M., Y. Wang, és mtsa. (2013). *Fermentation of Propionibacterium acnes, a commensal bacterium in the human skin microbiome, as skin probiotics against methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. *PLoS One* 8(2): e55380.

123. Shuber, A. P., J. Skoletsky, és mtsa. (1993). *Efficient 12-mutation testing in the CFTR gene: a general model for complex mutation analysis*. Human Molecular Genetics 2(2): 153-158.
124. Sørensen, M., T. N. Mak, és mtsa. (2010). *Mutagenesis of Propionibacterium acnes and analysis of two CAMP factor knock-out mutants*. Journal of Microbiological Methods 83(2): 211-216.
125. Stackebrandt, E., C. Cummins, és mtsa. (2006). Family Propionibacteriaceae: The Genus Propionibacterium. *The Prokaryotes*. M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer és E. Stackebrandt, Springer New York: 400-418.
126. Stehr, F., M. Kretschmar, és mtsa. (2003). *Microbial lipases as virulence factors*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 22(5–6): 347-355.
127. Steiner, B., S. Romero-Steiner, és mtsa. (1997). *Cloning and sequencing of the hyaluronate lyase gene from Propionibacterium acnes*. Canadian Journal of Microbiology 43(4): 315-321.
128. Stephan, R., N. Cernela, és mtsa. (2011). *Rapid species specific identification and subtyping of Yersinia enterocolitica by MALDI-TOF Mass spectrometry*. Journal of Microbiological Methods 87(2): 150-153.
129. Tagami, H. (2008). *Location-related differences in structure and function of the stratum corneum with special emphasis on those of the facial skin*. International Journal of Cosmetic Science 30(6): 413-434.
130. Tarr, P. I., C. A. Gordon, és mtsa. (2005). *Shiga-toxin-producing Escherichia coli and haemolytic uraemic syndrome*. The Lancet 365(9464): 1073-1086.
131. Termeer, C. C., J. Hennies, és mtsa. (2000). *Oligosaccharides of hyaluronan are potent activators of dendritic cells*. The Journal of Immunology 165(4): 1863-1870.
132. Tomida, S., L. Nguyen, és mtsa. (2013). *Pan-Genome and Comparative Genome Analyses of Propionibacterium acnes Reveal Its Genomic Diversity in the Healthy and Diseased Human Skin Microbiome*. mBio 4(3).
133. Turvey, S. E. és D. H. Broide (2010). *Innate immunity*. The Journal of Allergy and Clinical Immunology 125(2): S24-S32.
134. Unna, P. (1896). *The histopathology of disease of the skin*. The American Journal of the Medical Sciences 112(2): 199-200.
135. Urb, M. és D. C. Sheppard (2012). *The role of mast cells in the defence against pathogens*. PLoS Pathogenes 8(4): e1002619.
136. Valanne, S., A. McDowell, és mtsa. (2005). *CAMP factor homologues in Propionibacterium acnes: a new protein family differentially expressed by types I and II*. Microbiology 151(Pt 5): 1369-1379.
137. Ventura, M., C. Canchaya, és mtsa. (2007). *Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum*. Microbiology and Molecular Biology Reviews 71(3): 495-548.

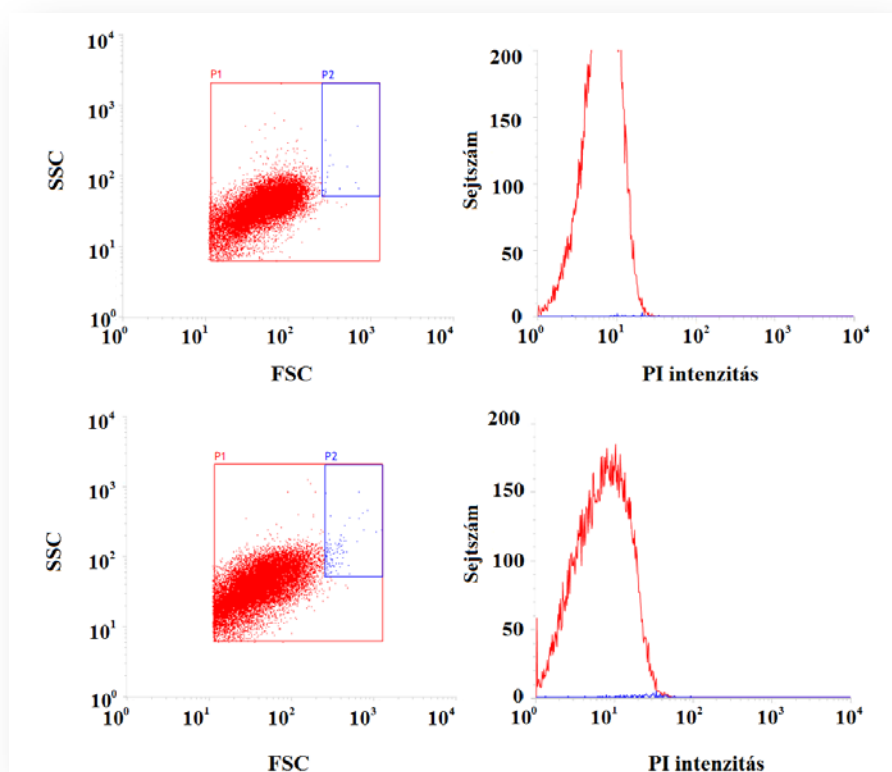
-
138. Von Freudenreich E. , O.-J. S. (1906). *Über die im emmentalerkäse stattfindende propionsäuregärung.* Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene 17: 529-543.
139. Webster, G. (2000). *Combination azelaic acid therapy for acne vulgaris.* Journal of the American Academy of Dermatology 43(2 Pt 3): S47-50.
140. Webster, G. F. (1995). *Inflammation in acne vulgaris.* Journal of the American Academy of Dermatology 33(2 Pt 1): 247-253.
141. Webster, G. F. (1998). *Topical tretinoin in acne therapy.* Journal of the American Academy of Dermatology 39(2): S38-S44.
142. Webster, G. F. és C. S. Cummins (1978). *Use of bacteriophage typing to distinguish Propionibacterium acne types I and II.* Journal of Clinical Microbiology 7(1): 84-90.
143. Wieser, A., L. Schneider, és mtsa. (2012). *MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics—identification of microorganisms and beyond (mini review).* Applied Microbiology and Biotechnology 93(3): 965-974.
144. Williams, H. C., R. P. Dellavalle, és mtsa. (2012). *Acne vulgaris.* The Lancet 379(9813): 361-372.
145. Williams, J. G., A. R. Kubelik, és mtsa. (1990). *DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers.* Nucleic Acids Research 18(22): 6531-6535.
146. Zou, S., C. Stansfield, és mtsa. (1998). *Identification of new influenza B virus variants by multiplex reverse transcription-PCR and the heteroduplex mobility assay.* Journal of Clinical Microbiology 36(6): 1544-1548.

10. FÜGGELÉK

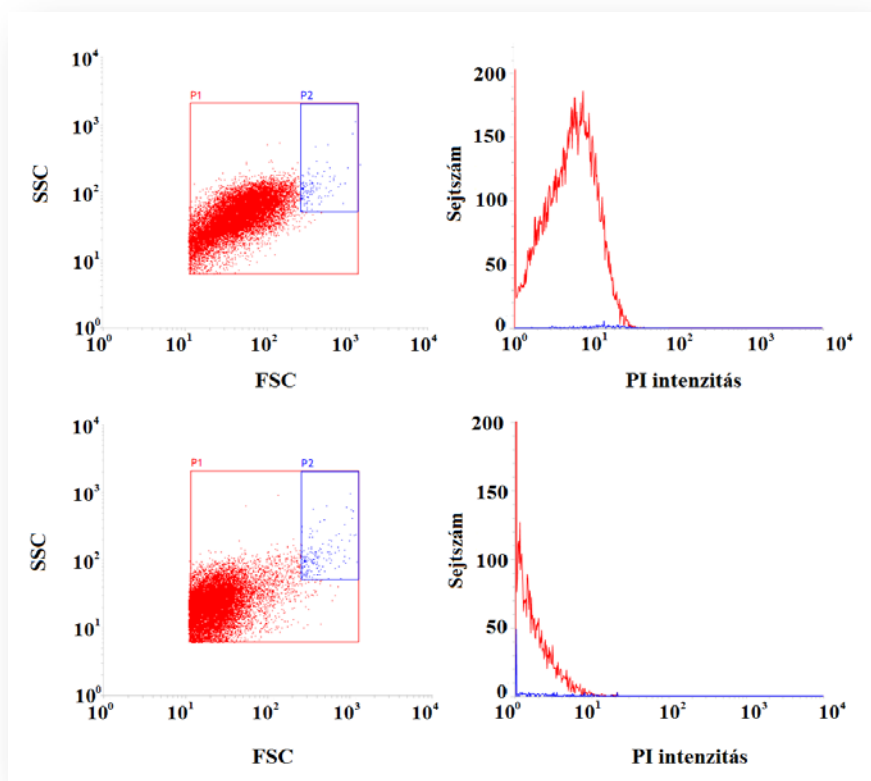
Izolátum	Régió	Eredet	eMLST			MALDI -TOF
			Allél profil	eST	Filotípus	Filotípus
55835	HU	<i>Cystitis</i>	1-1-1-3-1-1-1-1	eST-1	IA1	IA
3632	HU	Hemokultúra	1-1-1-3-1-1-1-1	eST-1	IA1	IA
4579	HU	Bőr izolátum	1-1-1-3-1-1-1-1	eST-1	IA1	IA
12604	HU	Pleurális folyadék	1-1-1-3-1-1-1-1	eST-1	IA1	IA
16634	HU	Acne	1-1-1-3-1-1-1-1	eST-1	IA1	IA
50460	HU	Acne	1-1-1-3-1-1-1-1	eST-1	IA1	IA
63006	HU	Sebhely arcról	1-1-1-3-1-1-1-1	eST-1	IA1	IA
19107	HU	Műtét után tályog	1-1-1-3-1-1-1-1	eST-1	IA1	IA
20550	HU	Intraabdominális izolátum	1-1-1-3-1-1-1-1	eST-1	IA1	IA
44064	HU	Felsőszíni sérülés	1-1-1-3-1-1-1-1	eST-1	IA1	IA
64745	HU	Tályog	1-1-1-3-1-1-1-1	eST-1	IA1	IA
15614	HU	Hemokultúra	1-1-1-3-1-1-2-2	eST-3	IA1	IA
26048	HU	Hemokultúra	1-1-1-3-1-1-2-2	eST-3	IA1	IA
28585	HU	Hemokultúra	1-1-1-3-1-1-8-6	eST-4	IA1	IA
PRP-60	GB	Acne	5-1-1-3-1-1-1-1	eST-20	IA1	IA
76793	HU	Intraorális izolátum	1-1-1-3-1-14-1-1	eST-101	IA1	IA
19695	HU	Sérülés	1-15-1-3-1-1-1-1	eST-103	IA1	IA
44264	HU	Hemokultúra	21-1-1-3-1-1-1-6	eST-104	IA1	IA
44261	HU	Hemokultúra	21-1-1-3-1-1-1-6	eST-104	IA1	IA
56853	HU	Szív implantátum	1-1-1-3-1-1-1-6	eST-105	IA1	IA
P.acn33	FR	Csarnokvíz	1-1-1-5-1-4-8-2	eST-2	IA2	IA
P.acn17	FR	Szaruhártya izolátum	1-1-1-5-3-5-8-7	eST-22	IA2	IA
P.acn31	FR	Csarnokvíz	1-1-1-13-1-4-8-2	eST-36	IA2	IA
6609	HU	Egészséges bőr	1-1-1-4-1-4-8-6	eST-5	IB	IB
89071	HU	Felsőszíni sérülés	1-1-1-4-1-4-8-6	eST-5	IB	IB
96088	HU	Bőr izolátum	1-1-1-4-1-4-8-6	eST-5	IB	IB
102778	HU	Izületi folyadék	1-1-1-4-1-4-8-6	eST-5	IB	IB
1945	HU	Pleurális folyadék	1-1-1-4-1-4-8-6	eST-5	IB	IB
4837	HU	Sebészeti izolátum	1-1-1-4-1-4-8-6	eST-5	IB	IB
10738	HU	Arcról származó tályog	1-1-1-4-1-4-8-6	eST-5	IB	IB
16703	HU	Középfülgyulladás	1-1-1-4-1-4-8-6	eST-5	IB	IB
20527	HU	Hemokultúra	1-1-1-4-1-4-8-6	eST-5	IB	IB
14179	HU	Hemokultúra	1-1-1-4-1-4-8-6	eST-5	IB	IB
23766	HU	Sérülés arcon	1-1-1-4-1-4-8-6	eST-5	IB	IB
24728	HU	Sérülés	1-1-1-4-1-4-8-6	eST-5	IB	IB
45808	HU	Intrauterin eszköz	1-1-1-4-1-4-8-6	eST-5	IB	IB
51056	HU	Intraorális izolátum	1-1-1-4-1-4-8-6	eST-5	IB	IB
58828	HU	Kötőhártya váladék	1-1-1-4-1-4-8-6	eST-5	IB	IB
57826	HU	Kötőhártya váladék	1-1-1-4-1-4-8-6	eST-5	IB	IB
61489	HU	Vakbélgyulladás	1-1-1-4-1-4-8-6	eST-5	IB	IB
80329	HU	Tályog	1-1-1-4-1-4-8-31	eST-12	IB	IB
74873	HU	Hemokultúra	1-1-1-4-1-4-8-21	eST-42	IB	IB
67060	HU	Felsőszíni sérülés	1-1-1-4-1-4-8-21	eST-42	IB	IB

101320	HU	Sebészeti izolátum	1-1-1-4-1-4-8-34	eST-98	IB	IB
24763	HU	Intraabdominális izolátum	1-1-1-4-1-4-26-6	eST-99	IB	IB
PRP-38	GB	Acne	9-1-4-8-6-8-14-14	eST-70	IC	IC
72995	HU	Sebészeti izolátum	15-4-2-4-2-3-10-10	eST-7	II	II
44073	HU	Hemokultúra	15-4-2-4-2-3-10-10	eST-7	II	II
65763	HU	Hemokultúra	15-4-2-4-2-3-10-10	eST-7	II	II
65311	HU	Hemokultúra	17-9-2-4-2-3-10-10	eST-25	II	II
ATCC11828	USA	Subcután tályog	17-4-2-4-9-12-10-13	eST-27	II	II
76618	HU	Hemokultúra	17-4-2-4-2-6-10-12	eST-30	II	II
6187	HU	Hemokultúra	17-4-2-4-2-6-10-12	eST-30	II	II
12553	HU	Hemokultúra	15-4-2-4-2-3-24-10	eST-90	II	II
63848	HU	Kötőhártya váladék	20-4-2-4-2-6-10-12	eST-100	II	II
46361	HU	Acne	15-4-2-19-2-3-10-10	eST-106	II	II
12S	BR	Hypomelanosos	7-6-3-7-5-9-12-15	eST-32	III	III
Asn12	GB	Csigolyaközi porckorong	7-6-3-7-5-9-13-16	eST-33	III	III
Va2/5	HU	Egészséges bőr	7-6-3-7-5-9-13-16	eST-33	III	III
Asn13	GB	Csigolyaközi porckorong	7-6-3-11-5-9-13-16	eST-73	III	III
Asn10	GB	Csípőprotézis	7-6-3-7-7-5-9-12-16	eST-81	III	III

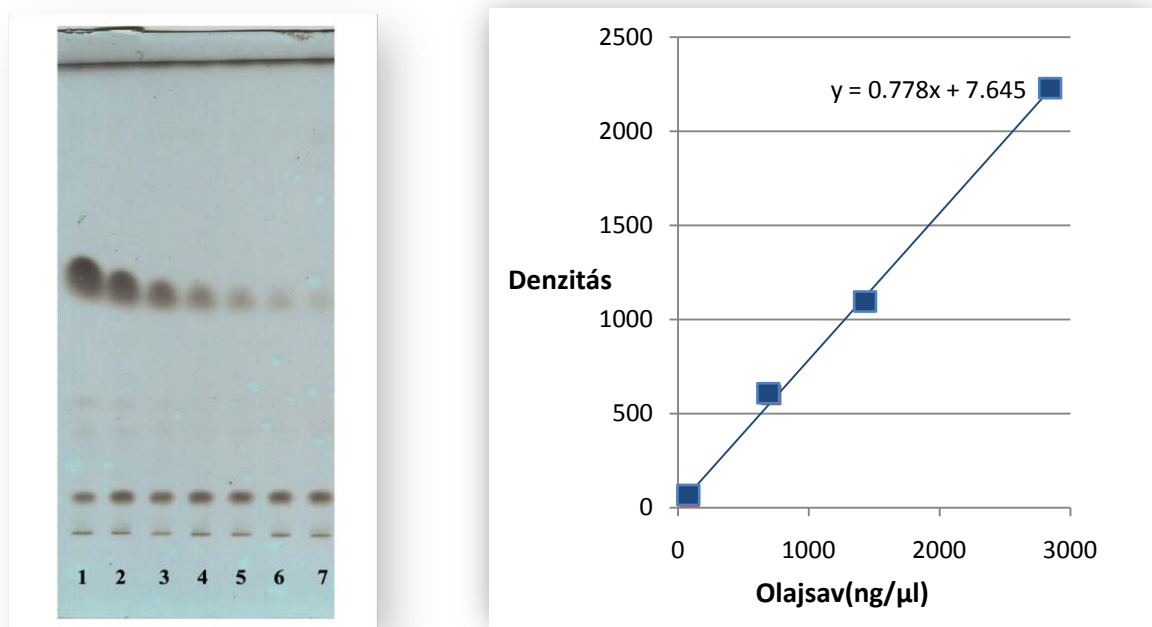
1. táblázat. A MALDI-TOF MS analízis során használt klinikai izolátumok adatai.
Régiók rövidítése: USA: Amerikai Egyesült Államok, BR: BRazília, FR: Franciaország,
HU: Magyarország, GB: Nagy Britannia.



1. ábra. Áramlásos citometria felvétel a vad típusú törzsről.



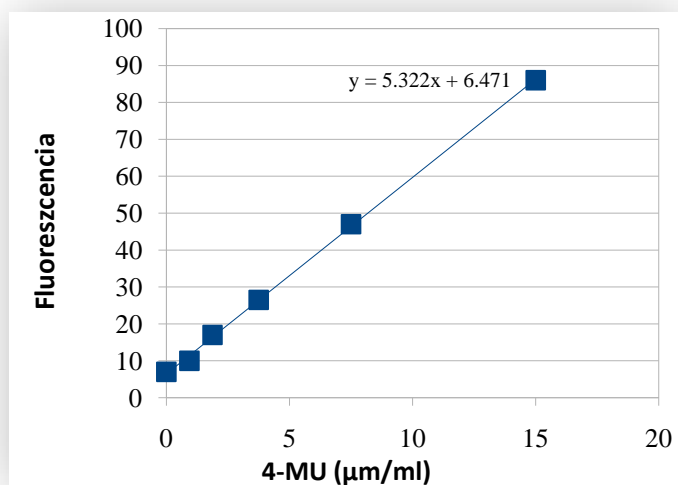
2. ábra. Áramlásos citometria felvétel a megnyúlt fenotípust mutató törzsről.



3. ábra. A TLC analízis során felhasznált standard olajsav és a kísérlet során felhasznált kalibráló egyenes.

	Olivaolaj	3 óra inkubáció	24 óra inkubáció	Filótípus
PRP-60	-	28.77	13.47	IA1
	+	25.84	15.81	
P.acn33	-	2.88	1.51	IA2
	+	7.13	2.42	
P.acn17	-	25.54	23.77	IA2
	+	49.68	20.07	
P.acn31	-	21.12	3.56	IA2
	+	22.37	6.45	
6609	-	3.16	1.36	IB
	+	5.07	3.28	
ATCC11828	-	4.64	4.79	II
	+	4.8	5.72	
12S	-	10	6	III
	+	13.6	14.36	

2. táblázat. Az izolátumok hidrolitikus aktivitása. Az összefoglaló táblázatban az aktivitások unitban kifejezett értékeinek az átlag láthatóak: 3 és 24 óra elteltével, ill. az indukálás állapotával.



4. ábra. A 4- MU- Oleát fluometriás kísérletek során használt kalibráló egyenes.