

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

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Hunyadkürti Judit

Témavezető: Dr. Nagy István

Biológia Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar

MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Biokémia Intézet

Szeged

2014.

BEVEZETÉS ÉS CÉLKITÚZÉS

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 patogénnek, amelyek együttesen egy dinamikus közösséget alkotva alakítják ki az egyénre jellemző flórát. Számtalan tanulmány hipotézisként felveti, hogy ennek a közösségnek a populáció-szintű arány-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*, a *Malassezia furfur* és a *Propionibacterium acnes*. Ez utóbbi egy Gram-pozitív, nem spórázó, anaerob, opportunista baktérium, amely elsősorban az acne vulgaris kialakulásával hozható összefüggésbe. Ezen kívül számtalan más súlyos lefolyású betegségben is szerepet játszik, mint például a szaruhártyafekély, szív-belhártyagyulladás, szarkoidózis, ízületi hártya gyulladása, hyperostosis és osteitis. A felsorolt betegségek patogenezise és ezen belül a *P. acnes* pontos szerepe azonban máig nem ismert. Az idült gyulladással járó acne vulgaris legtöbbször a faggyúmirigyekben gazdag területeken jelentkezik, mint pl. 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 - a *P. acnes* is rendkívül könnyen válik rezisztenssé a különböző antibiotikumokra.

Bőrünk, mint legnagyobb szervünk a dinamikus közösséget alkotó mikroorganizmusokkal együttesen egy olyan ökoszisztémának tekinthető, amelyen fiziológiailag és topográfiaailag jól elkülönülő élőhelyeket tudunk elkülöníteni. Annak érdekében, hogy jobban megismerjük és elkülönítsük a kommenzalista, valamint a potenciálisan patogén, továbbá az antibiotikum rezisztens törzseket, nélkülözhetetlen a bőr mikrobiomjának a jellemzése.

Mindezek ismeretében munkám során az alábbi célokat tűztem 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, majd olyan specifikus régiók azonosítása, amelyek az antibiotikum rezisztenciáért, a virulenciáért és a morfológiai különbségekért felelősek, és kizárólag az adott filogenetikai csoportra jellemzőek.
4. A *P. acnes* újonnan leírt, a III-as filogenetikai csoportba tartozó törzseinek morfológiai és áramlásos citometriás vizsgálata annak eldöntésére, hogy az atipikusan hosszú fenotípust mutató sejtek 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, ezáltal a *P. acnes* kolonizáció dinamikájának intra- és interperszonális szintű jellemzése.
6. A máig ismert összes *P. acnes* filogenetikai törzs triacilglicerol lipáz aktivitásának vizsgálata vékonyréteg kromatográfiás módszerrel annak érdekében, hogy megállapítsuk a szekretált hidrolitikus enzim pontos szerepét a baktérium patogenitásában.
7. Mivel máig nincs a *P. acnes*-re használható génmanipulációs (ki/beütési) módszer, ezért egy hatékony és reprodukálható génmanipulációs rendszer kidolgozása és alkalmazása egy acne vulgarisból izolált patogén törzsön, majd a létrehozott mutáns törzs hidrolitikus jellemzése.

ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

Azonosítási és osztályozási módszerek

Multiplex PCR

Laboratóriumunk a rendelkezésére álló >30 *P. acnes* izolátum teljes genomszekvenciájának felhasználásával 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 megbízhatóan besorolni - a jelenleg ismert 6 fő (IA₁, IA₂, IB, IC, II, III) 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. Az izolátumok azonosítása a PCR során keletkező eltérő méretű ampliconokon 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 típusban jelen lévő régiót képes amplifikálni míg az *atpD* és a *recA* gének primerpárjai a II-es és III-as típus adott régióit amplifikálják. Teljes genomszekvenálási 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 amplifikálja fel. 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 az MPCR során megbizonyosodhatunk arról, hogy az adott izolátum valóban *P. acnes*.

eMLST (expanded Multilocus Sequence Typing)

Laboratóriumunk teljes genomszekvenálásokból nyert adatai lehetőséget biztosítottak számunkra, hogy kiválasszuk azokat a géneket, amelyek segítségével kifejleszthettük a tipizálási sémát. Hat háztartási gén (*aroE*, *atpD*, *gmk*, *guaA*, *lepA*, *sodA*) részlegesés, 2 gén (*tly* és a *camp2*) teljes szekvenciáját használtuk fel az eMLST kidolgozásához. A PCR reakció után az

amplikonok szekvenciát kapilláris elektroforézis (3500 Series Genetic Analyzer; Life Technologies) módszerrel határoztuk meg. A szekvenciákat Genomic Workbench (CLC Bio) szoftverrel illesztettük, majd hasonlítottuk össze a referencia adatbázissal. Az MLST adatbázisba (<http://pubmlst.org/pacnes/>) történő feltöltés után meghatároztuk az izolátumok e-szekvencia típusait (Sequence Type; eST).

MALDI-TOF MS

A tömegspektrometriai mérésekhez Microflex LT MALDI-TOF készüléket használtunk (Bruker Daltonik). 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) használtunk. Az izolátumok azonosítását a gyártó szerinti beállítások szerint hajtottuk végre.

Folikulus-specifikus mintavétel

A nantesi Bőrklinika bőrgyógyászai specifikusan az egyes aknés betegek papulláiból, pustuláiból, komedójáiból, valamint proximális egészséges bőrfelületről gyűjtötték számunkra mintákat így ez a mintavételezés lehetőséget biztosított, hogy a *P. acnes* kolonizációjának dinamikáját intra- és interperszonális szinten is vizsgáljuk. Az egyénenként és specifikus területenként gyűjtött mintákat tápfolyadékban növesztettük anaerob körülmények között 24 órán át, majd a 10^{-1} – 10^{-4} hígításban szemiszelektív táptalajra szélesztettük. A kitenyésztett izolátumok telep morfológiájának a vizsgálata után, MPCR-el és eMLST-vel azonosítottuk az izolátumok genotípusát.

Filogenetikai analízis

eBURST (eBased Upon Related Sequence Types)

Az eMLST analízis során kapott allél profil analízisére 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-ket klonális komplexekbe soroltuk azzal a kritériummal, hogy a komplex tagjai nem több mint 1 lókuszban térhetnek el, tehát a lehetséges 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 eBUSRT alkalmazásával olyan csoportok leszármazási útvonalt követjük nyomon, melyek izolátumai nagyon hasonlóak, szemben egy filogenetikai fával ahol az izolátumok genotípusának a hasonlóságáról kapunk információt.

Teljes genomok *de novo* szekvenálása

Minden törzs esetében nagy mennyiségű és tisztaságú gDNS-t preparáltunk majd SOLiD (Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection) szekvenáló rendszer segítségével határoztuk meg a nukleotid sorrendjüket. Elsőként a szekvenáláshoz adapterekkel ellátott mate-paired könyvtárat készítettünk. Ezután egy emulziós PCR-ben gyöngyökre hibridizáltuk és felamplifikáltuk a DNS fragmenteket. A gyöngyök dúsítása után a speciális szekvenáló primereket a gyöngy adaptereihez hibridizáltuk, majd a négy különböző fluoreszcens festékkel jelölt, két bázist tartalmazó próbákat ligáltuk. A szekvenálás során kapott fragmenteket Genomics Workbench (CLC Bio) és Omixon Gapped Alignment plugin (Omixon) szoftverek segítségével analizáltuk. A kontigok közötti zárást PCR reakciókkal majd 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.

Atipikus morfológiát mutató filogenetikai típus fenotípusának vizsgálata

Pásztázó elektronmikroszkóp

A kiválasztott törzsek szuszpenzióját fedőlemezen szárítottuk be majd 24 órán át 4 °C-on fixáltuk a sejteket 2.5% (v/v) glutáraldehid, 0.05 M kakodilát pufferben (pH 7.5). Következő napon a mintákat jégen tartva etanollal (50%-100% v/v) dehidratáltuk ezután az abszolút alkoholt lecseréltük terc-butanolra, majd a mintákat liofilizáltuk. Az arany bevonat elkészítése után HITACHI S-4700 berendezésen elektronmikroszkópos felvételeket készítettünk.

Sejtszeparálás

A kiválasztott baktériumtörzseket 24 órán át 70%-os (v/v) etanolban fixáltuk. PBS-es mosást követően a sejtek aggregációjának megszüntetése érdekében szonikáltuk a sejteket (1.5

perc 0.5 másodperces ciklusokban; 75%-os amplitúdóval), majd 10 µg/ml koncentrációjú propidium-joddal (λ_{ex} : 540 nm; λ_{em} : 608 nm, Sigma) megfestettük. A sejtek DNS tartalmát és méretét FACS Jazz (BD Biosciences) áramlásos citométerrel vizsgáltuk.

A filogenetikai törzsek hidrolitikus aktivitásának meghatározása

Vékonyréteg kromatográfia

Mintaelőkészítés. A különböző filogenetikai csoportba tartozó baktériumokból tenyészetet készítettünk. Anaerob körülmények között, a tápoldatot 2% olívaolajjal kiegészítve exponenciális (OD_{600} : 0.5) fázisig növesztettük a baktériumokat. Ezután a sejteket kiülepítettük és a felülúszót leszűrtük. A fehérje koagulációjához a felülúszót ammónium-szulfáttal kezeltük. 85%-os ammónium szulfát telítettség elérése után 4 °C-on egy éjszakán át inkubáltuk az extraktumokat. 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 mosással távolítottuk el. A fehérje koncentráció meghatározása Qubit fluoriméterrel (Life Technologies) történt.

Vékonyréteg kromatográfia (TLC). 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 37 °C-on. A reakció hidrogén-kloriddal való leállítása után a mintákat vákuumszárítóban beszárítottuk, majd toluolban feloldottuk. Ezután 5 µl-t a felső fázisból szilika gélre vittünk fel (Linomat 5, Camag) 3 mm sáv szélességben. A hidrolízis végtermékeit Petrol-éter:dietil-éter:formát (80:30:1) futtató elegyben választottuk szét. Futtatás után a szilika gélt szobahőmérsékleten megszáritottuk, majd az előhívó folyadékkal (10% réz-szulfát, 8% foszfor-sav) lefűjtük. Levegőn való szárítás után a gélt 100 °C-os szárítószekrénybe helyeztük 10 percre. Pozitív kontrollként (89 g/ml (w/v)) analitikai standard olajsavat 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 egység az a lipáz mennyiség, ami 350 ng olajsavat szabadít fel egy óra alatt.

Fluorimetriás lipáz aktivitás meghatározása

A vizsgált törzseket ugyanolyan körülmény között növesztettük, mint a vékonyréteg kromatográfiás módszer során. A sejtek kiülepítése után a felülúszót leszűrtük, ezután 10K NMWL Amicon csövekben 2 ml-re bekonzentráltuk a gyártó leírása szerint. A minták szabad zsírsav tartalmától háromszori n-hexános mosás révén szabadultunk meg, fehérje tartalmuk meghatározása pedig Qubit fluoriméter segítségével történt (Life Technologies). Annak érdekében, hogy a pontos szubsztrát-specifikus hidrolitikus aktivitását vizsgáljuk a különböző törzseknek 4-metilumbelliferil-oleát (4-MU-O) fluorigenikus szubsztrátot használtunk a gyártó leírása szerint (λ_{ex} : 327nm; λ_{em} :449nm, 0.1 M foszfát puffer, pH 7.0 és 37 °C). A mintákat 3 órán át inkubáltuk a szubsztráttal, majd végpont analízist végeztünk (FLUOStar Optima). A kalibrációhoz 4-metilumbelliferil (4-MU) 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 meghatároztuk a minták 4-MU/mg fehérjetartalmát.

Mutagenézis

Az általunk kiválasztott PRP-38-as (IC típus) aknából izolált törzsünkön deléciós mutagenézist hajtottunk végre kettős homológ rekombináció segítségével. A homológ rekombináció alapjául szolgáló deléciós kazetta elemeit fúziós PCR segítségével 2 lépésben állítottuk össze. Az első PCR reakcióban előállítottuk a kazetta A és C elemét. A két komponens a deletálni kívánt géntől upstream illetve downstream elhelyezkedő 500-500 bp hosszúságú régió. A felamplifikált szakaszokat a PCR reakció során az el nem használt primerektől megtisztítottuk, majd egy következő PCR reakcióban az A komponens forward és C komponens reverse primereivel templátként használtuk fel őket. Az előállításukhoz felhasznált primerekre (A reverse, C forward) a könnyebb felszaporítás érdekében ráépítettük egymás komplementer nukleotidjait (20 bázis). A PCR reakciók során a hiba nélküli átírás végett proof-reading polimerázt alkalmaztunk. Az így kapott AC komponenst SmaI-restriktív enzimmel emésztett pk19 vektorba ligáltuk be. A ligálást követően *Escherichia coli* DH5 α kompetens sejtbe

transzformáltuk a ligátumot. A kanamicin rezisztens (50 µg/ml) pozitív klónokon univerzális plazmid primerekkel (univ, opseq) kolónia PCR-t végeztünk, és a kapilláris elektroforézissel meghatározott, megfelelő pozíciójú inszertet tartalmazó klónokat kiválasztottuk. Az így előszelektált klónokból plazmidot tisztítottunk majd a vad típusú RPR-38-as törzsbe protoplaszt képzéssel (10 mg/ml lizozim 37 °C, 30 perc) 100 ng plazmidot transzformáltunk és kanamicines véres-agarra szélesztettük. Egy hét anaerob körülmények között történő növesztés után a megjelenő telepeken kolónia PCR-el leellenőriztük a plazmid jelenlétét. A pozitív klónokból egyet kiválasztottunk és kanamicines BHI folyadékba leoltottuk. A felnövesztett tenyészetből 96 lyukú sejtenyésztő lemezben replikát készítettünk. Az így előállított replikátumot újabb 10 alkalommal átreplicáztuk kanamicin és kanamicin nélküli táptalajára. 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 hidrolitikus aktivitását vékonyréteg kromatográfiás és fluorimetriás vizsgálatokkal ellenőriztük.

EREDMÉNYEK

Bőrünkön, szervezetünk első védelmi vonalán nemcsak kommenzalista hanem patogén formában is előforduló *P. acnes* egy Gram-pozitív, coryneform, nem spórázó, anaerob, oportunista baktérium, amelyet számos kórkép megjelenésével hoztak összefüggésbe. Leggyakrabban az acne vulgaris kialakításában játszik szerepet, amely multifaktoriális eredetű betegség, és a pilosebaceous folliculusok krónikus gyulladása jellemzi. A betegség elsősorban a serdülőkorúak és fiatal felnőttek körében jelentkezik, 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 ezért 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 immáron 6 filogenetikai típus elkülönítésével. Ezáltal nemcsak 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 genomsekvenciáinak összehasonlításával számos különbséget azonosítottunk: ezek 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 is megvizsgáltuk, és egy chaperon fehérjében aminosav-cserével járó mutációt azonosítottunk. Az atipikus sejteket immun- és elektro-mikroszkópos valamint áramlási citometriás módszerek segítségével tovább vizsgálva megállapítottuk, hogy a megnyúlt sejtek egyetlen sejtnek tekinthetőek.

61 klinikai *P. acnes* izolátumon az eMLST mellett MALDI-TOF MS analízist végeztünk el, annak érdekében, hogy megvizsgáljuk a többi klinikai alkalmazhatóságát. A MALDI-TOF MS mérések azt mutatták, hogy az izolátumok legnagyobb arányban az IA és IB, kisebb arányban a II-es filogenetikai csoportba tartoznak; ezek az eredmények teljes mértékben egyeznek az eMLST eredményekkel. Megállapítottuk továbbá, hogy a MALDI-TOF MS a fő filogenetikai csoportokba való besorolásra alkalmas ugyan, azonban ezzel a módszerrel nem kapunk pontos képet a nagyobb filogenetikai csoportokba besorolt izolátumokról, ellentétben az általunk kifejlesztett eMLST módszerrel.

Az általunk optimalizált 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. A kísérletek alapján elmondható, hogy egy fOLLIKULUST ugyanabba a filogenetikai típusba továbbá ugyanabba az eST-be tartozó törzs kolonizálja.

Az acne vulgaris kialakulásában potenciális patogén faktor a faggyú túltermelődése. A megtermelődött szébum lipidekben gazdag így az itt élő baktériumok, elsősorban a *P. acnes* számára kiváló energiaforrás. Reprerentálva az összes filogenetikai csoportot, a törzsek zsírsav hidrolízisét vékonyréteg kromatográfiás kísérletekkel vizsgáltuk. A kísérlet során megállapítottuk, hogy a potenciálisan patogén törzseknek nagyobb hidrolitikus aktivitása van, így az intermedierek termelése révén megnő a gyulladásképző hatásuk.

Ahhoz, hogy a *P. acnes* patomechanizmusának a molekuláris folyamatait jobban megismerjük, elengedhetetlen egy hatékony genetikai manipulációs rendszer. Munkám során ezért kidolgoztam egy antibiotikum rezisztencia gén inszerciója nélküli génmanipulációs stratégiát, amelyet a *gehA* gén deléciójára használtam fel. Az előállított mutáns lipáz aktivitását megvizsgálva elmondható, hogy az aktivitása kétharmad részre csökkent összehasonlítva a vad típusú törzssel. Az általunk kidolgozott stratégia így a jövőben felhasználható további potenciális virulencia faktorok vizsgálatához is.

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

Hunyadkürti J., Feltóti Zs., Horváth B., Nagymihály M., Vörös A., McDowell A., Patrick S., Urbán E. and Nagy I. (2011) Complete Genome Sequence of *Propionibacterium acnes* Type IB strain 6609. Journal of Bacteriology vol: 193, issue 17; 4561-4562.

IF=3.825

Horváth B., **Hunyadkürti J.**, Vörös A., Fekete C., Urbán E., Kemény L. and Nagy I. (2012) Genome Sequence of *Propionibacterium acnes* Type II strain ATCC 11828. Journal of Bacteriology vol: 194, issue 1; 202-203.

IF=3.194

Vörös A., Horváth B., **Hunyadkürti J.**, McDowell A., Barnard E., Patrick S. and Nagy I. (2012) Complete Genome Sequences of three *Propionibacterium acnes* Isolates from the Type IA₂ Cluster. Journal of Bacteriology vol: 194, issue 6; 1621-1622.

IF=3.194

McDowell A., **Hunyadkürti J.**, Horváth B., Vörös A., Barnard E., Patrick S. and Nagy I. (2012) Draft Genome Sequence of an Antibiotic Resistant *Propionibacterium acnes* strain, PRP-38, from the Novel Type IC Cluster. Journal of Bacteriology vol: 194, issue 12; 3260-3261.

IF=3.194

Nagy E., Urbán E., Becker S., Kostrzewa M., Vörös A., **Hunyadkürti J.** and Nagy I. (2013) MALDI-TOF MS fingerprinting facilitates rapid discrimination of phylotypes I, II and III of *Propionibacterium acnes*. Anaerobe vol: 20:20-26.

IF=2.022

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ EGYÉB KÖZLEMÉNYEK

Ördög L., **Hunyadkürti J.**, Vörös A., Horváth B., Szűcs A., Urbán E., Kereszt A., Kondorosi E. and Nagy I. (2013) Complete Genome Sequence of *Propionibacterium avidum* isolated from human skin abscess. Genome Announcements 1(3):e00337-13.

NYILATKOZAT

Alulírott Dr. Nagy István, mint levelező szerző nyilatkozom, hogy Hunyadkürti Judit Complete genome sequence of *Propionibacterium acnes* type IB strain 6609 címmel megjelent közleményben végzett munkája meghatározó jelentőségű.

A jelölt által felhasznált tudományos eredmények eddig nem szerepeltek más doktori (Ph.D.) értekezésben, mint ahogyan a jövőben sem szerepelhetnek más doktori (Ph.D.) disszertációban.

Szeged, 2014. február 26.

Dr. Nagy István (témavezető, levelező szerző)

Hunyadkürt Judit (jelölt)