

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
Általános Orvostudományi Kar
Klinikai Mikrobiológiai Diagnosztikai Intézet

XXXI. OTDK Biológia Szekció

**Nagyméretű plazmidok izolálása és analízise *Bacteroides*
fajok esetén**

FENYVESI VIKTOR SÁNDOR
II. évfolyam biológus MSc hallgató

TÉMAVEZETŐ: DR. SÓKI JÓZSEF
KONZULENS: DR. KUCSERA JUDIT

Szeged
2012.

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

as	aminósav
BHI	brain-heart infusion (szív-agy kivonat)
BHIS	supplemented brain-heart infusion (kiegészített BHI)
bp	bázispár
ccc	covalently-closed circular (kovalensen zárt cirkuláris)
CTn	konjugatív transzpozon
EDTA	etilén-diamino-tetraacetát
IS	inszerációs szekvencia (elem)
kb	kilobázispár
kDa	kiloDalton
LB	Luria-Bertani tápfolyadék
LPS	lipopoliszacharid
MLS	makrolid-lincosamin-streptogramin
MTn	mobilizálható transzpozon
Nm ^r	5-nitroimidazol rezisztencia fenotípus
oc	open cirkuláris
ORF	open reading frame
RbTCA	rubídium-triklór-acetát
rpm	revolution per minute (fordulatszám/perc)
SDS	sodium dodecylsulphate (nátrium dodecilsulfát)
TBE	Tris-borát-EDTA
Tc ^r	Tetraciklin rezisztencia fenotípus
TE	Tris-EDTA
Tris	trisz-hidroximetil-amino-etán
v	volume (térfogat)
w	weight (súly)

TARTALOMJEGYZÉK

I. BEVEZETÉS	4
I.1. A <i>Bacteroides</i> genus és rokon taxonok filogenetikája.....	4
I.2. A <i>Bacteroides</i> nemzetség leírása	5
I.2.1. <i>B. fragilis</i>	7
I.2.2. <i>B. thetaiotaomicron</i>	8
I.2.3. <i>B. ovatus</i>	9
I.2.4. <i>B. uniformis</i>	9
I.2.5. <i>B. vulgatus</i>	9
I.2.6. <i>B. salanitronis</i>	9
I.2.7. <i>Parabacteroides distasonis</i>	10
I.3. Antibiotikum rezisztencia	10
I.4. A <i>Bacteroides</i> fajok mobilis genetikai elemei.	11
I.4.1. Plazmidok	11
I.4.2. IS elemek és transzpozonok.....	14
I.4.3. Egyszerű transzpozonok	15
I.4.4. Konjugatív transzpozonok. (CTn)	15
I.4.5. Mobilizálható transzpozonok. (MTn)	17
I.5. A plazmidok izolálási módszereinek fiziko-kémiai háttere	17
I.6. Next generation sequencing	19
II. CÉLKITŰZÉSEK.....	20
III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	21
III.1. Baktérium törzsek és tenyésztésük.....	21
III.2. Plazmid izolálási módszer	22
III.3. Restrikciós enzim emésztés és agaróz gélelektroforézis	22
III.4. Southern transzfer, jelölt próba készítése és hibridizáció	23
III.4.1. Southern blot	23
III.4.2. Jelölt próba készítése.....	24
III.4.3. Hibridizáció	24
III.5. Next Generation Sequencing.....	24
IV. EREDMÉNYEK	25
IV.1. Szekvenált nagy <i>Bacteroides</i> plazmidok összehasonlítása	25
IV.2. Plazmid izolálási kísérleteink.....	25
IV.3. Homológia vizsgálat	27
IV.4. Kiválasztott törzsek plazmid mintáinak szekvenálása	30
V. MEGBESZÉLÉS	33
VI. TARTALMI ÖSSZEFOGLALÓ	35
VII. IRODALOMJEGYZÉK	36
VIII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	40
IX. FÜGGELÉK.....	41
X. NYILATKOZAT A PÁLYÁZÓ EGYÉNI HOZZÁJÁRULÁSÁRÓL A PÁLYAMŰBEN LEÍRT EREDMÉNYEKHEZ	46

I. BEVEZETÉS

A humán béltraktus (különösen a vastagbél) rejti az egyik leggazdagabb ismert mikrobiális életközösséget, amely legalább 500-1000 fajt és 7000 törzset tartalmaz, főként *Bacteroidetes* és *Firmicutes* fajokat. A vastagbél tartalma egyfajta komplex biopolimer mátrix, ami főként a gazda által felhasználhatatlan poliszacharidokból (Pl.: mukopoliszacharidok, xilánok és nem cellulóz glükánok), valamint a gazda mirigyei által kiválasztott anyagokból (nyálka) áll. Az itt élő mikroorganizmusok alkalmazkodtak a sajátos körülményekhez, képesek elviselni ezt az anaerob miliőt, melyben gyakorlatilag nem található könnyen felhasználható mono- és diszacharid, ezért ezeknek a biopolimereknek a hidrolíziséből kénytelenek beszerezni a tápanyagokat, melyet extracelluláris és periplazmatikus enzimek (hidrolázok és reduktázok) segítségével végeznek, ezen kívül képesek lebontani a gazda által termelt anyagokat is. Eközben mono- és diszacharidokat szabadítanak fel, amit mind a gazda, mind, pedig a többi mikroorganizmus felhasználhat, ezek egyfajta asztalközösséget (kommenzalizmus) alkotnak. Másrésről ez egy igen kiváló élőhely körülbelül állandó hőmérséklettel és nedvességtartalommal, valamint a biopolimerek nyújtotta nagy felszínnel, ami lehetőséget nyújt a nagy mértékű biofilm képzésre. Ez az együttélés a gazdának is hasznos mivel a mikrobák az említett szacharidokon kívül különböző szerves savakat (rövid szénláncú zsírsavakat, pl. acetát, butirát), valamint B és K vitaminokat termelnek, amiket a gazdaszervezet felhasznál, ezért az együttélés kölcsönösen hasznos (mutualizmus, szimbiózis). [1, 4]

I.1. A *Bacteroides* genus és rokon taxonok filogenetikája

A *Cytophaga-Flavobacter-Bacteroides* (CFB) phylum a Bacteria egyik főbb és korán elkülönült ága, aminek evolúciója igen kifejezett és gyors volt. Két nagyobb csoportra lehet osztani a cytophaga-flavobacter és a *Bacteroides* csoportra. A cythophaga-flavobacter csoport tagjait számos természetes és mesterséges ökoszisztémában megtalálták (Pl.: talaj tengervíz, légkondicionáló, klinikai izolátumok). Képesek lebontani az olyan polimereket, mint a cellulóz, agar és a kitin. A változatos életterük és a nagy metabolikus potenciáljuk fontos csoporttá teszi őket. Négy alcsoport alkotja: *Cytophaga*, *Flavobacter*, *Sphingobacter* és *Saprospira*. A *Bacteroides* csoportot (Bacteroidia osztály és Bacteroidales rend) 3 fő taxonra

bontották: *Prevotellaceae*, *Bacteroidaceae* és *Porphyromonadaceae* családok. Korábban a 80-as évek végéig a *Bacteroides* csoport hagyományosan egy gyűjtőcsoport volt. Minden anaerob, Gram negatív, nem spórázó pálcát ide soroltak. Ezeket főként eredetileg az emberi bélcsatornából tenyésztették ki, de ahogy tanulmányozták a tej mikroflóráját, tengeri emlősök és szárnyasok bélflóráját a csoport mérete igen megnőtt és diverzé vált (28-61mol% G+C). Ez szükségessé tette a csoport újra definiálását. Számos kemotaxonómiai karaktert használtak, mint a légzési lánc kinonjainak megléte, hosszú szénláncú zsírsavak összetétele, a hexóz monofoszfát sönt enzimjeinek a megléte, peptidoglikán mezo-diaminiopimelinsav tartalma és a DNS mol% G+C tartalma, és DNS-DNS hibridizáció foka. Ezen kívül vizsgálták a 16S rDNS bázis sorrendjét filogenetikai módszerekkel. Ennek következtében két nagy fajcsoportot választottak le a *Bacteroides* genuszból, a *Prevotella* genuszt (mérsékelten szacharolitikus) és a *Porphyromonas* genuszt (nem fermentatív) valamint számos monospecifikus nemzetséget. A *Bacteroides* fajok élőhelye a bélrendszer alsó traktusa, addig a *Prevotella* és *Porphyromonas* fajok a szájüregben és a kórökök beldőjében fordulnak elő. A bacteroideseken belül korábban elkülönítettek egy csoportot, a *Parabacteroides* genuszt, a zselatin bontás hiánya miatt. Ezt a csoportot a 16S rDNS szekvencián alapuló filogenetika fán is elkülönültnek találták, és a *Prevotellaceae* családba sorolták. Ilyek fajok a *P. distasonis*, *P. merdae* és a *P. goldsteinii*. [1, 4]

I.2. A *Bacteroides* nemzetség leírása

A *Bacteroides* fajok a leggyakoribb és egyik legfontosabb csoport a mikroorganizmusok közül, amik kolonizálták az emberi vastagbelet, megközelítőleg 30%-a székletből származó izolátumoknak, ami becslés szerint 10^9 - 10^{10} g⁻¹ baktériumot jelent, de ez függ a gazda fiziológiai állapotától is. A *Bacteroides* nemzetségbe tartozó fajok meghatározása:

- a) Gram negatív, nem mozgó, nem spórázó, enyhén pleomorf pálca alakú (bacillus),
- b) általában obligát anaerob,
- c) kemo-organotróf,
- d) szacharolitikus, fő metabolikus végtermékként acetátot és szukcinátot termelnek,
- e) képesek 20% epesavakat tartalmazó táptalajon nőni,
- f) aesculint képesek hidrolizálni, nitrátot nem redukálnak nitritté, indol variábilisek,
- g) pentóz foszfát útvonal-hexóz monofoszfát sönt enzimeivel rendelkeznek,

- h) a membránjuk szfingolipideket tartalmaz, hosszú szénláncú zsírsavakkal keverve, főleg egyenes szénláncú, telített antezio-metil és izo-metil kapcsoltakkal,
- i) a légzési kinonok menakinonok 10 és 11 izoprén alegységből,
- j) a peptidoglükán tartalmaz mezo-diaminopimelosavat,
- k) 39-40 mol% G+C tartalom a DNS-ben.

Általánosan kataláz negatívak de a *Bacteroides fragilis*, *B. thetaiotamicron*, *B. vulgatus* és *B. ovatus* néhány törzsénél kimutatták, hogy termelnek katalázt és szuperoxid dizmutáz enzimet. A *Bacteroides* fajok háromféle lehetséges ökológiai interakcióban vehetnek részt: szimbiotikus/mutualista, kommenzalista és patogénikus/parazita. Jelentős szerepet játszanak a vastagbélben található biopolimerek lebontásában, periplazmatikus és extracelluláris enzimeik segítségével bontják le azokat és felszabadítják a tápanyagokat a többi mikroorganizmus számára is. [1, 4] Legjobban tanulmányozott a *B. thetaiotaomicron* amelynek 172 glikozilhidrolázt, 11 olyan enzimet, ami a gazda által termelt anyagok lebontásáért termel, ilyen enzimek a β -glükoronidáz, β -glükozidáz, arilszulfatáz és nitroreduktázok, amik lehetővé teszik ezen a polimerek lebontását, 163 a külső membránban található poliszacharid kötő proteint és 20 cukor specifikus transzportert mutattak ki a proteomjában [18]. Ez is mutatja, hogy milyen nagy a *Bacteroides* fajok metabolikus potenciálja. Szintén termelnek rövid szénláncú zsírsavakat és K₁ vitamint (menaquinon), amit a gazda felvehet, míg a gazda fukózt tartalmazó glükánokat termel, ami indukálja a *B. thetaiotaomicron* enzim rendszerét és elősegíti a kolonizációt (újszülött egereknél). Fontos szerepet játszanak más nemzetségekkel együtt a normális vékonybél epithélium fejlődében, valamint az epesavak lebontásában és a szervezet általi újra felhasználásában. Pozitív szerepük ellenére opportunistá patogénként is felléphetnek, leggyakoribbak pleuropulmonáris, intraabdominális, női genitális traktus és a bőr, kötőszövet és csontfertőzésekben. A két leggyakoribb patogén faj a *B. fragilis* és a *B. thetaiotaomicron*. A *B. fragilis* az enterális klinikai minták 60%-ában azonosítják, pedig az egészséges széklet mintákból mindösszesen 0,5 %-ban azonosították. Hajlamosító faktorok az immunosuppresszió, sebészeti beavatkozás, keringési rendellenesség (diabéteszes betegeknél stb.) szükségesek a fertőzéshez. A fő patogenitási faktorok: tok poliszacharidok, adhezinek, lítikus enzimek (proteinázok, kollagenázok, fibrinolizinek, neuraminidázok, foszfatazok, dezoxiribonukleázok, hialuronidázok, kondroitin-szulfatázok és heparinázok), enterotoxin (fragilizin), a gyenge endotoxin (LPS) és az aerotolerancia. Ezek segítségével képesek kolonizálni a szöveteket és megtéveszteni az immunrendszert. A szöveti nekrozis és az alacsony vérellátás csökkenti a redoxpotenciált, ez megfelelő körülményeket teremt a szaporodáshoz. Ezért a vaszkuláris

betegség, hideg, sokk, trauma, műtét, idegen test, rák, ödéma, és bakteriális gáztermelés szignifikánsan fogékonnyá teheti az egyéneket a *Bacteroides* fertőzésre, mint prior fertőzés lehet, aerob és fakultatív baktériumokkal. A Gram negatív, anaerob bacilúsokat tartalmazó fertőzéseket gyakran jellemzik tályog és szöveti degradáció keltőként. Azoknak a bacteroideseknek, amiket klinikai mintákból izoláltak magasabb neuraminidáz és hialuronidáz szintje, mint amiket egészséges személy székletéből izoláltak. [1, 4] A bacteroideseknek összetett poliszacharid tokja van, ami két nagy molekula tömegű poliszacharidból áll (PS-A és PS-B). A PS-A ismétlődő tetraszacharidokból áll, míg a PS-B ismétlődő hexaszacharidokból áll, az ismétlődő egységek mindkettőnél tartalmaznak pozitív és negatív töltésű tagokat, zwitterionosak. A két különböző poliszacharid eltérő ösztötlést mutat a fiziológiás pH-n és az expressziójuk is eltérő a baktérium felszínén. Ezen kívül a *B. fragilis*-nél ismernek még egy harmadik típust is a PS-C-t. Az immunrendszer megtévesztésének módja a *Bacteroides* poliszacharid tok szerkezetének variabilitásában keresendő. A *B. fragilis*nek 8, a *B. thetaiotaomicron*nak 7 különböző kapszuláris poliszacharidot szintetizáló lókusza (CPS) van, melyek ki-be kapcsolhatók reverzibilis inverziók által [1, 4, 37, 38]. Ezt DNS invertázok okozzák, ilyen például a *mpi* gén, ami 13 különböző DNS régió inverzióját vezérli beleértve a CPS-ek promóterjeit tartalmazókat. A *B. fragilis* esetében 256-féle kombináció lehetséges. A CPS lókuszek egy vagy két konzervált regulátoros proteint (UpcY és UpcZ homológok) és ezektől upstream található szénhidrát szintézisért felelős gének találhatóak. Ezenfelül a *B. fragilis* tok poliszacharidjai képesek fekélyeket indukálni a bélrendszerben, amit erős immunválasz okoz. A tok poliszacharidok úgy is segítik a baktérium túlélését, hogy képesek csökkenteni a makrofágok iNOS (nitrogén-oxid szintáz) aktivitását és ezáltal a NO termelését, csökken a makrofágok ölü képessége.[4]

I.2.1. *B. fragilis*

Leggyakrabban izolált belső fertőzésekből (akár 60%). De normális emberi székletben mindösszesen ~1%-ban fordul elő, fertőzéskor szignifikánsan megnő az aránya. A friss izolátumokat általában kapszula borítja, de máskülönben azonos a morfológiájuk a többi fajéval. Hidrolizál aesculint, savat produkál (fermentálja) glükózból, laktózból, szacharózból, maltózból és rendszerint xilózból is, nem produkál savat ramnózból, trehalózból, mannitolból és szalicilátból vagy arabinózból. Indolt nem termel (hasznos fenotipikus markere a nemzetségnek). A virulencia tagadhatatlanul multifaktoriális és köszönhető a poliszacharid burok birtoklásának vagy egy több extracelluláris vagy membrán asszociált enzimnek (pl.:

adhezinek). Képes elviselni és növekedni nanomólos mennyiségű oxigén jelenlétében, megtalálható a fajnál a citokróm bd [1]. Obligát anaerobok, de „nananaerob” kifejezést is használják rá, mivel nanomólos O₂-koncentráció esetén növekedni tud [5]. Ez előnyt jelent számukra a kolonizációban és a patogéntáshoz is hozzájárul, mivel túl kell élniük a következő gazda kolonizációja előtt, mert nem képesek spórát képezni. A sejtfal gyenge endotoxikus aktivitású lipopoliszacharidot tartalmaz. A külső membrán fajspecifikus protein komponenseit azonosították (SDS-PAGE). A külső membránon kívül van egy merev poliszacharid kapszula, ami 1,5-2-szer merevebb, mint a sejtfal. Nagy molekula tömegű variábilis poliszacharidból áll, antifagocitotikus hatással rendelkezik, valamint véd a komplement rendszer mediálta lízistől a sejtfali antigének elleni antitestek által. A kapszuláris antigének faj specifikusak. Egyes törzseknek az enterotoxin termelése is jelentős lehet. A *B. fragilis* enterotoxinja a fragilizin ami, a sejtmembrán lyukacsosságát és az F-aktin reorganizációját okozza enterocitákban, ezáltal hasmenést okoz embernél, nyulaknál, malacoknál és borjúknál. [1, 16] Az enterotoxin egy kis polipeptid, egy 1192 bp-os ORF kódol egy 397 as. méretű holotoxint. A pre-protein egy 168 aminosavból álló 20,7 kDa tömegű aktív toxinra hasad, ami a kultúra médiumba szekretálódik. A toxin (fragilizin néven ismert) egy cinkkötő motívummal rendelkező metalloproteáz. Három különböző altípus ismert *B. fragilis* között és 80%-ban azonos a nukleotid szekvenciájuk. A metalloproteázok fontos baktérium virulencia faktorok a patogén baktériumoknál és metasztázisokat idézhetnek elő rosszindulatú tumoroknál, aktiválja a protoxinokat, a citotoxinokat és elősegíti a bakteriális inváziót és a behatolást. [1, 4]

I.2.2. *B. thetaiotaomicron*

Distasotól, a román mikrobiológustól kapta a nevét (1912), három görög betűt kombinált: théta, ióta, omikron. Az emberi vastagbél közönséges kommenzalistája és szimbiontája, a második leggyakoribb a nemzetségéből, amit klinikai fertőzésekben izolálnak, ahol oppurtunista patogén szerepet játszik. Nem fermentálja a mannitolt és variábilis reakciót mutat az aktívszén-zselatin lemezzel, néhány törzs jól emésztí de mások nem vagy nagyon gyengén. Néhány tanulmány az összes indol pozitív törzset, ami nem *B. ovatus* a *B. thetaiotaomicron* fajba sorolja. Akárhogy is ez érvényteleníthetné a többi ismert indol pozitív alcsoportot vagy fajt. 2003-ban megszekvenálták *B. thetaiotaomicron* VPI 5482-es törzset. Kromoszómája cirkuláris, 6260361 nukleotid hosszú, 42 % a G+C tartalom. 4864 feltételezett

gént találtak, ebből 4778 lehetséges proteint kódoló. Ez a törzs hordoz egy nagyobb méretű plazmidot is: p5452 (33 kb), G+C összetétel 47 %. Utóbbi plazmidon 38 gént találtak. [1]

I.2.3. *B. ovatus*

Ritkábban találkozhatunk vele, mint a többi fajjal a nemzetségből. Nem fő komponense a vastagbél mikroflórájának és alkalmanként izolálják klinikai mintából. Amikor nagy számot ér el a fertőzésben akkor patogénnek tekinthető. Sokféle cukrot képes fermentálni, többfélét, mint a nemzetség többi faja. Fermentálja szalicilátot és a mannitot. Indolt termel, és emészt aktívszén-zselatin lemezeket néhány napon belül. [1]

I.2.4. *B. uniformis*

Ezt a fajt Eggerth és Gagnon írta le 1933-ban. Ez az organizmus normálisan megtalálható humán székletmintában, csak ritkán kapcsolódik klinikai fertőzéshez. Gyakran említik együtt más indol pozitív fajokkal, mint a *B. thetaiotaomicron*. Néhány törzse jól nő olyan táptalajon, amihez 20% Nátrium-taurokolátot (epesavfajta) adtak, (mint a *B. vulgatus*). Aktívszén-zselatin lemezeket általában néhány napon belül lebontja. [1]

I.2.5. *B. vulgatus*

Szintén Eggerth és Gagnon izolálta emberi székletből 1933-ban. A nemzetség legközönségesebb faja a normális humán székletben, fertőzésekben csak alkalmanként található meg. Indolt nem termel, a faszén-zselatint néhány napon belül bontja. A nemzetség már tagjaival ellentétben a *B. vulgatus* törzsek 50% nem, vagy csak gyengén bontja az aesculint. [1]

I.2.6. *B. salanitronis*

A normális élőhelye a csirkék vakbele. Epe jelenlétében képes nőni, hidrolizálja az aesculint, kataláz és ureáz negatív. A glükóz anyagcseréjének a fő végterméke a szukcinát és

az ecetsav. Az uralkodó hosszú láncú zsírsava az antesio-C₁₅ kevés iso-C₁₅ és C_{16:0}3-OH és iso-C_{17:0}3-OH-val. A legfontosabb légzési kinonok azok menakinonok, döntően MK-11 és MK-12. A genomi DNS-ének 47 mol% a G+C tartalma. [1]

I.2.7. *Parabacteroides distasonis*

Eggerth és Gagnon izolálta 1933-ban székletből. A *B. vulgatus*-hoz hasonlóan közönségesen előfordul a székletmintában, de ritkán képes fertőzést okozni. Szinte az összes törzs képes ramnózt fermentálni, egy szignifikáns kisebbségtől eltekintve. Indolt nem termelnek és aktívszén-zselatin korongokat lassan, vagy egyáltalán nem emésztik. [1]

I.3. Antibiotikum rezisztencia

Igen magas az antibiotikum rezisztencia foka a különböző *Bacterioides* törzseknél és gyorsan terjed. Ehhez főként a különböző mobilis genetikai elemek járulnak hozzá, melyek ebben a nemzetségben és rokonságában igen elterjedtek és változatosak (ezekről a továbbiakban lesz szó). Erre kiváló példa a tetraciklin rezisztencia, amely a *tetQ* gén által okozott fenotípus és egy konjugatív transzpozonon található a *Bacteroides* fajokban. Vizsgálatok szerint a 70-es évek előtről származó mintákban a gén előfordulási aránya 22%, addig az 1980-95 közötti mintákban már 81%. Míg az egészséges izolátumokban 32%-ról 81%-ra (1996-97) nőtt. Ugyanez *ermF* makrolid rezisztencia génre (mind plazmid, mind transzpozon által terjesztett), amely klinikai izolátumokban 9-ről 30%-ra és míg egészségesekben 0-ról 15%-ra változott. A *Bacteroides* törzsek szinte mindegyike termel (93%) β -laktamázt. [17] Legalább 6-féle β -laktamáz gén ismert, előfordulhatnak plazmidon és kromoszómálisan is. *Bacteroides* törzsekben előfordul clindamycin, erithromycin és metronidazol rezisztencia, amik szintén mobilis genetikai elemekhez asszociáltak. A *Bacteroides* fajok anaerob voltak miatt érzéketlenek az aminoglikozidokra. Ezek fekális-orális úton érkeztek az emberi testbe és horizontális géntranszfer segítségével a *Bacteroides* fajokba. Ilyen, például az *erm* (erithromycin rezisztencia) gének, amik Gram pozitív fajokból kerültek a bacteroidesekbe. Főképpen háziállatokban szelektálódtak ki, mivel régen jelentős mennyiségű antibiotikumot etettek az állatokkal, ami jótékony hatással volt a növekedésükre. [1, 4]

I.4. A *Bacteroides* fajok mobilis genetikai elemei.

A baktériumoknak (ezen belül a *Bacteroides* fajoknak) számos különböző típusú mobilis genetikai elemük lehet. Ilyenek a bakterifágok, intronok, plazmidok, IS elemek, egyszerű és összetett transzpozonok, konjugatív transzpozonok (CTn), mobilizálható transzpozonok (MTn) [19]. A plazmidok a fágokkal és az integratív konjugatív elemekkel együtt a kulcs vektorai a horizontális géntranszfernek és fontos eszközei a biotechnológiának. Elengedhetetlen részei a gyors adaptációnak. Gyakran kódolnak olyan géneket, amik szükségesek a detoxifikációhoz, virulenciához, ökológiai interakcióhoz (Pl.: bakteriocinek), esetleg felelősek az antibiotikum rezisztenciáért [15, 19]. Ezekre az új tulajdonságokra szert tevő törzseknek megnőhet a szaporodási előnye/fitnesze. A mikróbáknak viszonylag kis méretű kromoszómális genomjuk van (szelekciós előnyt jelent, ugyanis kisebb genomot könnyebb replikálni), ehhez tartozik egy nagy méretű, erősen variábilis pán genom („gene pool”), melyet ezek az átvihető (konjugatív és mobilizálható) genetikai elemek alkotnak. A genetikai információ átvitelhez, hozzájárul még a transzdukció (fágok által átvitt genetikai információ) és a transzformáció (a baktériumok képesek felvenni szabadon a közegben lévő DNS-t), ezek azonban kevésbé jelentősek, mint a konjugációval terjedő genetikai elemek, mert jóval korlátozottabb a méret tartományuk [15]. Ugyanakkor vannak olyan elemek, amelyek nem hordoznak semmilyen hasznos tulajdonságot, ezeket kriptikusnak nevezzük. [19] A genomba integrálódó elemek (IS elemek, konjugatív és mobilizálható transzpozonoknak) tulajdonsága, hogy a bakteriális genomba beékelődve képesek megváltoztatni a gének működését Pl.: felerősíthetik egy antibiotikum rezisztencia gén működését. [19, 20]

I.4.1. Plazmidok

A plazmidok kettősszálú cirkuláris genetikai elemek, amelyek általában a „kromoszómális” genomtól függetlenül önállóan replikálódnak. Eszenciális tulajdonságuk a replikációra való képesség (*rep* gének) és az átvihetőség. Három típusuk, lehet: a konjugatív (önállóan képes átjutni a donorból a recipiensbe), mobilizálható (egy másik genetikai elem segítségével képes ezt megtenni) és a nem átvihető plazmidok. Ahhoz, hogy egy plazmid önállóan át tudjon jutni a donorból a recipiensbe, két gén klasztert tartanak esszenciálisnak, a MOB géneket és az MPF (Mating Pair Formation) géneket. A MOB génekhez a tartozik az

oriT régió, relaxáz gén, T4CP gén. Az MPF génekhez sok gén tartozik, ezek a T4SS gének, amelyek a pilust építik fel és a DNS transzferben van szerepük. Azt a plazmidot ami a MOB géneket és az MPF géneket is hordozza, így önállóan képes konjugálni, konjugatív plazmidnak nevezzük. Ha egy plazmid egy másik genetikai elem MPF-jét használja azt mobilizálható plazmidnak nevezzük, ha nem hordozza egyiket sem, akkor nem átvihető. A mobilizációhoz szükséges legalapvetőbb protein a relaxáz. Ez képes felismerni az *oriT* (transzfer origó) régiót a plazmidon és bontja azt az egyik meghatározott nukleotid sorrendet tartalmazó szálon. Az egyszálú DNS végéhez kapcsolódva (más proteinekkel együtt, relaxoszóma részeként) részt vesz a transzlokációban, a donorba átjutva pedig a recirkularizációban. Ez a két elem elégséges a plazmid mobilizációjához. Az önátvitelre képes plazmidoknak ezen kívül még egy T4CP (type 4 coupling protein) gént és a T4SS géneket is hordozniuk kell. A T4SS (Type 4 secretion system) génjei formálják a pilust, ezeket *tra* géneknek is nevezik, ami lényegében egy membrán asszociált protein szekréciós rendszer, a relaxoszómát juttatja át és a hozzákapcsolt egyszálú DNS-t. T4CP gén által kódolt protein, pedig hozzá kapcsolódik a pilushoz és felismeri a relaxoszómát, valamint szolgáltatja a működési energiát a transzlokációhoz. [15] A hfr plazmidok képesek beépülni a genomba és onnan kivágódva átvinni a donor kromoszómális génjeit a recipiensbe, ami homológ rekombinációval beépül. [39]

A *Bacteroides* fajoknál nagyon gyakoriak a különböző méretű plazmidok, melyek mérete 2,7 kb-tól 80 kb-ig terjed. [19] A tapasztalataink szerint akár e mérettartománynál jóval nagyobbak is előfordulnak. Méret szerint két tartományra lehet osztani őket, a kis méretű plazmidokra (2,7-10 kb) és a nagy plazmidokra (>10 kb). A kisméretű plazmidok igen gyakoriak (26-50%) mind klinikai, mind, pedig egészséges mintából izolált törzseknél. A legtöbbjük a három homológia csoportba sorolható, ezek a ClassI (2,7 kb), a ClassII (4,2 kb) és a ClassIII (5,6 kb). A ClassII csoportba tartozik még két ritka különböző méretű, de homológ alcsoport a Class IIB (5.0 kb) és a IIC (7.9 kb) [40]. Fertőzésekől izolált törzseknél a leggyakoribbnak a ClassIII-as plazmidokat találták, utánuk a ClassII-es plazmidok következtek gyakoriságban [2, 3]. Ezeket a plazmidokat általában kriptikusnak tekintik, de a megszekvenált pBFP35 (ClassIII) plazmidon a mobilizáláshoz és replikációhoz szükséges géneken kívül sikerült kimutatni két másik ORF-et, az egyiket lehetséges lipoproteinnek tekintik [2]. Egy ClassI osztályba tartozó plazmidot is megszekvenáltak, a pBI143-at, amit valóban kriptikusnak találtak [41]. A pLV422a plazmidnak (ClassII) részben ismert a szekvenciája (a mobilizációhoz szükséges géneké) [46]. A kisméretű plazmidok mobilizálhatóak. A nagyméretű plazmidok közül több antibiotikum rezisztenciával

rendelkező plazmidot mutattak ki. Az első, amiket felfedeztek bacteroidesekben MLS (macrolide–lincosamide–streptogramin) rezisztenciát hordoznak, amit az *ermF* (és az *ermFS*, egy bázis különbség) okoz, ezek a gének Tn4351, Tn4400 és a Tn4551 transzpozonokon találhatóak, amelyeket a pBF4 (41 kb), pBFTM10 (15 kb, más néven pCP1) és a pIB136 (80 kb) [35] nagy plazmidok hordoznak. Mindhárom nagy plazmid átvihető konjugációval. A pBFTM10 mobilizálható, amíg a másik kettő önátvitelre képes. Az 5-nitroimidazol rezisztenciát (Nm^r) okozó plazmidokat hármat ismernek: pIP417, -419 és a -421-et. Ezek kis méretű (7-10 kb) plazmidok, a *nimA*, *nimC* és *nimD* rezisztencia gének közül tartalmaznak egyet-egyet. [19, 31] A *nim* gének 5-nitroimidazol reduktázt kódolnak. Eddig nem ismernek más antibiotikum rezisztenciát kódoló plazmidot, de egy rokon fajban a *Prevotella ruminicola*-ban találtak egy tetraciklin rezisztenciát (Tc^r) kódoló plazmidot, a pRR14-et. A kisméretű kriptikus plazmidok (pLV22a és a pBI143) szekvencia vizsgálata és a kis méretű antibiotikum rezisztencia plazmidok részleges homológia vizsgálata (pBFTM10, pIP417, pIP419, és a pIP421) azt mutatja, hogy ezek moduláris felépítésűek, gén kazettákat tartalmaznak. Ezt bizonyítja, hogy a pBI143 *mob* régiójának 44 % G+C a tartalma, míg a *rep* régióának csak 33 %, különböző a kodon használatuk, valamint 56 bp inverted repeat szekvencia keretezi őket. [17, 19]

1. Táblázat. A főbb napjainkban ismert szekvenciájú *Bacteroides* törzsek és nagyméretű plazmidjaik. (Az adatok a NCBI/www.ncbi.nlm.nih.gov adatbázisából származnak)

Faj	Törzs	Plazmid	Méret (bp)	ORF
<i>B. fragilis</i>	NCTC 9343	pBF9343	36560	47
	YCH46	pBFY46	33716	47
<i>B. salanitronis</i>	DSM 18170	pBACSA01	40303	56
		pBACSA02	19280	25
		pBACSA03	6277	8
<i>B. thetaiotaomicron</i>	VPI-5482	p5482	33038	38

A szekvenált nagyméretű plazmidok (1. Táblázat) elemzése számos ORF-et mutatott ezek nagy része ismeretlen funkciójú. Megtalálhatók rajtuk a replikációhoz, mobilizációhoz és a transzferhez szükséges gének. Ezen felül még számos feltételezett funkciójú gént találtak rajtuk. Ilyenek a DNS resolváz (p5482, pBACSA01, pBACSA02, pBF9343), topoizomerázok, transzmembrán domainnel rendelkező fehérjék, regulációs proteinek, DNS kötő (Hu) proteinek (pBF9343, pBFY46), hiszton családba tartozó DNS kötő fehérje (pBACSA01, pBACSA02), fágyszerű transzkripció regulációs protein (pBFY46), külső

membrán proteáz (pBFY46), a plazmid stabilitásáért felelős gének stb.. A *B. salanitronis* DSM 18170 [30] plazmidjain található együttvéve a legtöbb ORF, amelyekhez valamilyen funkciót kapcsolnak. A pBACSA03 valószínűleg a kriptikus kis plazmidok közé tartozik. A pBACSA01 plazmid TetR regulátor proteint, bakteriális toxin/antitoxin rendszer génjeit, konjugációs transzpozon géneket hordoz. A pBACSA02 plazmid Bacteriocin ABC transzportert és az antitoxin (abortive infection protein), bakteriális kétkomponensű jelátvitel (szenzor és transzkripció regulátor) génjeit hordozza. (Utóbbi adatok nem közöltek, az NCBI/www.ncbi.nlm.nih.gov adatbázisából származnak.)

I.4.2. IS elemek és transzpozonok

Az inszerciós szekvencia (IS - insertion sequence) elemek rövid fordított ismétlődésű szakaszokkal (inverted repeats) határoltak, és csak a mobilitásukat biztosító transzpozázokat kódolják. A transzpozáz enzim (egy vagy több ORF által kódolt) felismeri ezeket a rövid fordított ismétlődő szekvenciákat és képes az IS kivágására. A transzpozáz elhasítja a target site-ot, úgy, hogy túlnyúló végek keletkeznek. Ide épül be a transzpozon, úgy hogy a túlnyúló egyszálú DNS-sel érintkezik. A két hézagot a DNS polimeráz I tölti fel, a target site jellegzetesen megduplázódik. Az összetett transzpozonok két IS elem által közrefogott DNS szakaszból állnak és egyéb a baktériumnak hasznos, pl. antibiotikum rezisztencia géneket hordozhatnak. [19, 39]

Számos IS elemet írtak le a *Bacteroides* fajoknál, melyek önállóan vagy egy összetett transzpozon részeként képesek áthelyeződni. A bacteroidesek esetén a legtöbbet úgy fedezték fel, hogy egy antibiotikum rezisztencia gén kifejeződését segítették. Három összetett transzpozont ismernek eddig, a Tn4351, Tn4551 és a Tn4400-at, amik magukban foglalják az IS4351 és az IS4400-et. Ismert nem összetett IS elemek: IS942, IS1224, IS1168, IS1169, IS1170, IS1186. Ezek nem asszociáltak összetett plazmidokkal. Pl.: az IS942-t upstream mutatták ki a *ccrA* (*cfiA*) géntől, ami egy metallo β -laktamázt kódol. Az IS942-t 12 bp-os imperfekt ismétlődés határolja. Az IS elemek megtalálhatók plazmidokon is, ilyen például az IS1186, amit a pIP417-en találtak meg upstream a *nimA* géntől. [19]

A Tn4351-et és a Tn4551-et IS4351 elemek határolják, a Tn4400-at pedig IS4400 elem határolja [23, 19]. Mind a három tartalmaz MLS rezisztencia gént (*ermF* vagy *ermFS*). Az *ermF* gén 32 mol% G+C tartalmú, míg a *Bacteroides* 42 mol% G+C, ez és hasonlóság más *erm* génekkel azt sejteti, hogy ez a gén Gram pozitív baktérium eredetű. Ezeket a géneket a

széleken elhelyezkedő IS elemek upregulálják. A Tn4351-en és Tn4400-on található egy különleges, ismeretlen eredetű tetraciklin determináns (Tc^r) a *tetX*, amely kizárólag anaerob körülmények között működő képes, egy NADP-dependens oxidoreduktáz [10]. A Tn4551-en pedig, egy csendes streptomycin gén, az *aadS* található. Ezt az *ermF*-hez hasonlóan Gram pozitív eredetűnek tartják, mert 30%-ban homológ a *Bacillus subtilis aadK* génjével. [19]

I.4.3. Egyszerű transzpozonok

A baktériumoknál előfordulnak olyan transzpozonok, amelyek a transzpozázon kívül más géneket is hordoznak. A működésük hasonló a más típusú transzpozonokéhoz. Nem határolja őket IS elem, hanem egyszerű inverted repeat-ek. Erre példa az 5 kb méretű Tn3 transzpozon, amit 38 bp méretű inverted repeat határol. Három gént hordoz, egy transzpozáz (tnpA), egy rezolváz (tnbB; rekombinációs eseményekben játszik szerepet, nincs minden transzpozonon) és egy ampicilin rezisztencia gént (*bla*, β -laktamáz). A target site-ot 5 bp-on megduplázza. Képes replikatív integrációra kointegrációval. Egyszerű transzpozont még nem találtak eddig *Bacteroides* fajokban. [36]

I.4.4. Konjugatív transzpozonok. (CTn)

A konjugatív transzpozonok olyan mobilis genetikai elemek (65-150 kb), melyek a bakteriális kromoszómán találhatók, képesek onnan kivágnak. Ezután cirkularizálódnak (plazmidokhoz hasonló *oriT* régió található rajtuk) és plazmidokhoz hasonlóan konjugációval átjutnak egy recipiens mikroorganizmusba, ahol integrálódnak a kromoszómába. Cirkuláris formában nem képesek replikálódni. Három gén klaszter szükséges a működésükhöz, a *tra* (transzmissziós), *mob* (mobilizációs) és az *exc* (kivágódási). Ezen elemek integrációja nem random, a kromoszómán csak néhány hely van, ahova integrálódni képesek. Helyspecifikus rekombinációt alkalmaznak, a keretező szekvenciákat használják ehhez, egy rövid szekvenciát (4-5 bp) ismernek fel a genomban és oda integrálódnak. Nem duplikálják a target site-ot. Stabilabbak, mint a plazmidok és egyszerre több is lehet belőlük egy törzsben, nem lép fel inkompatibilitás. Tetraciklin rezisztenciát (Tc^r) hordoz a többségük, amit a *tetQ* gén kódol. Ez a protein riboszóma protekciós hatással rendelkezik: a fehérje terméke megakadályozza a tetraciklin kötődését. Ilyen konjugatív transzpozonok a Tc^r /CTnERL, Tc^r /CTnDOT (utóbbi alternatív elnevezése még: Tc^r Em^r DOT, CTnDOT), Tc^r /MLS-7853

(CTn7853) és a Tc^r/MLS-12256 (CTn12256), amelyeket Tc^r elemeknek is neveznek. [8, 19] Gram pozitív baktériumokban található a Tn916 (Tc^r) [26]. Ezeket az elemeket nevezhetik a szakirodalomban „integrative conjugative elements”-nek (ICEs) is más fajokban, ilyen néven írták le Pl.: a *Streptococcus thermophilus*-ban őket, a bacterodeseknél viszont általánosan konjugatív transzpozonoknak nevezik őket (CTn). Bizonyos nomenklaturai konvenciók szerint úgy jelölik őket, hogy a hordozott rezisztencia neve és a törzs azonosítója, amiben megtalálták. De ez sajnos nem általános minden CTn jelölésére. Akadnak közöttük kriptikusak is, mint az XBU4422. A CTnBst és a CTnGERM1 MLS rezisztenciát hordoznak ezt egy *ermB* vagy *ermG* gén okozza. A CTnDOT és a CTn12256 tetraciklin és MLS (*ermF* és *ermG*) rezisztenciát hordoznak. [8, 19, 28] Különleges tulajdonsága a Tc^r elemeket hordozó CTn-oknak, hogy tetraciklinnel (akár 1 µg/ml koncentrációval) indukálható a transzferük, és akár száz-ezerszeresére is növekedhet a frekvenciája. Ennek a mechanizmusnak az oka egy bakteriális kétkomponensű regulátor rendszer. A *tetQ* génnel együtt egy *rteA* (szenzor kináz) és *rteB* (regulátor) található egy operonban, valamint egy *rteC* gén, egy represszor (R) gén és X gének az operonon kívül. Az *rteB* aktiválja az *rteC*-t, ami aktiválja az önkivágódáshoz (*exc*) és a transzferhez szükséges géneket (*tra*) azáltal, hogy inaktiválja a represszort és aktivál bizonyos azonosítatlan X géneket, amik pozitívan hatnak a *rep/mob* génekre. A *rteB* elengedhetetlen a korezindes plazmidok (NBU, mobilizálható plazmidok), kivágódásához és transzlokációjához, míg az *rteC* nem szükséges hozzá. [6, 8, 9, 28, 32, 33] A *tetQ* gén start kodonja és a promóter között található egy leader mRNS, amin 3 hairpin (hajtű) szekvencia található a hp1, hp2 és a hp8. Ez a leader szekvencia ugyanekkor 3 leader proteint is kódol egy mindössze 3 aminosav hosszút, és két 16 aminosav hosszút, ebből a 3 aminosav hosszú tűnik esszenciálisnak. Tetraciklin hiányában az mRNS-hez kötődik a riboszóma és átíródik a leader tripeptid. A hp1 és a hp8 képezi a hajtű struktúrát, ami megakadályozza *tetQ* gén átíródását, mivel a hairpin tartalmazza a *tetQ* feltételezett riboszóma kötőhelyét, ezáltal nem engedi a riboszómát bekötni. Tetraciklin jelenlétében azok a riboszómák amikhez, tetraciklin kötődik, elakadnak a leader peptid mRNS-en és lehetővé teszik az mRNS konformáció váltását (hp1 és hp2 alakít hajtű struktúrát). A *tetQ* gén riboszóma kötőhelye felszabadul, és lehetővé válik a riboszómák bekötődése. A riboszómák, amikhez nem kapcsolódott tetraciklin transzlálják a *tetQ* gént. A TetQ fehérje megváltoztatja a riboszómák konformációját, és ezáltal megakadályozza tetraciklin kötődését. Ahogy nő a tetraciklint nem kötő riboszómák száma úgy az mRNS visszatér az eredeti konformációba és a *tetQ* mRNS nem transzlálódik - negatív regulációs hatás. [7] Ezek az elemek képesek kis mennyiségű tetraciklin jelenlétében, más genetikai elemek kivágódását és önátvitelét

regulálni, ezek lehetnek mobilizálható plazmidok és transzpozonok. [8, 19] A mobilizálható plazmidokat kétféleképpen is képes önátvitelre készíteni. A plazmid használhatja a CTn konjugációs apparátusát ez a transz mobilizáció, de a CTn beugorhat magába a mobilizálható plazmidba és egy kimérát képezve, juttatja át a donorba azt, ez a cisz mobilizáció. Ezek az elemek felelősek azért, hogy a *Bacteroides* fajok 80%-a tetraciklin rezisztens. [6]

I.4.5. Mobilizálható transzpozonok. (MTn)

Ezek s genetikai elemek a mobilizálható plazmidokhoz hasonlóan nem képesek az önátvitelre, de egy Tc^f helper elem segítségével képesek a konjugációra, csak MOB génekkel rendelkeznek. A helper elemek és a kis mennyiségű tetraciklin jelenlétében jelentősen megnő a kivágódásuk és az átvitelük esélye. Hat *Bacteroides* MTn ismert eddig: Tn4555, Tn4399, Tn5520, NBU1, NBU2, és az NBU3. Általában 9-12 kb közötti a méretük, kivételt képez a Tn5520, ami az összes baktérium nemzetségben észlelt eddigi legkisebb MTn, a 4,692 bp-os méretével. Kettő hordoz magán antibiotikum rezisztenciát, az NBU2 erithromycin és lincomycin rezisztenciát (*mefE-linA_{N2}*), a Tn4555 pedig cefoxitin (*cfxA*) rezisztenciát. A Tn4399 kivételével valamennyi tetraciklin indukálható, nem replikálódó, cirkuláris formában vihető át. [8, 19, 21, 29] Az NBU jelentése: Nonreplicating *Bacteroides* Units. 10-12 kb méretű mobilizálható genetikai elemek. Kevés homológiát mutatnak a CTn-okkal, nem azok kisméretű traszfer-defektív változatai. A CTn elemek képesek növelni a kivágódásuk és transzlokációjuk hatékonyságát. A kivágódásuk és integrációjuk λ -fág típusú. A végeikhez egy 14 bp szekvencia (*attN*) csatlakozik, aminek a kromoszómális felismerő helye az *attB*, ide hely-specifikus rekombinációval inszertálódnak, a target site-ot nem kettőzik meg. *Mob* génjük csak egy van, amely mind elhasítani, mind megkötni képes az egyszálú DNS-t. [19., 24.] A Tn4399 egy különleges mobilizálható transzpozon. 13 bp-os inverted repeat keretezi, és amikor integrálódik kis méretű duplikációt okoz, mint egy transzpozon. Kivágódásakor magával viszi a tartózkodási helyéről 5 bp-nyi DNS-t. [19, 25, 26, 27]

I.5. A plazmidok izolálási módszereinek fiziko-kémiai háttere

A plazmidok *in vitro* körülmények közötti analiziséhez, a gazdasejtből a plazmid DNS-t ki kell vonnunk. A plazmidok izolálásának általános lépései a következők:

1. A baktériumsejt feltárása, a sejtfaluk bontása, amely történhet enzimmal, detergenssel, hővel, vagy mechanikai úton,
2. A fehérjék, poliszacharidok és lipidek szeparálása a DNS-től, amely úgy történik, hogy maga a DNS marad az oldatban és a többi molekulát vonjuk ki valamilyen módszerrel (proteináz emésztés, detergens kezelés, fenol-kloroformos extrakció), vagy úgy, hogy a DNS-t kötjük meg (szilikagélen)
3. A DNS tisztítása és koncentrálása, ami lehetséges méret szerinti elválasztáson alapuló módszer, mint a CsCl vagy Rubídium-triklór-acetát (RbTCA) gradiens [11.] és gélelektroforézis segítségével, alkoholos kicsapással (etanollal vagy izo-propanollal), és affinitás kromatográfiával (QIAGEN®)

A plazmidok és a genomiális DNS elkülönítésekor, a közöttük lévő fiziko-kémiai különbségeket lehet kihasználni. Ilyenek a méretbeli különbség, a sejtmembránhoz való kötöttség, fehérjékkel való asszociáció és a DNS konformációja (superspiralizáltság, lineáris vagy kovalensen zárt). A genomi DNS nagyobb molekula tömegű, általában a sejthártyához kötött és fehérjékkel sűrűbben asszociált. Ezen felül érzékenyebb különböző denaturáló szerekre (lúgok, sók) és hőre, a kromoszómális DNS könnyebben denaturálódik és fragmentálódik mint a plazmidok, amik megtartják a „supercoil” formájukat, vagy ha denaturálódnak, gyorsabban visszanyerik natív szerkezetüket, mint a genomi DNS. Ezen a tulajdonságokon alapulnak különböző plazmid elválasztási technikák. [11, 12]

Az általunk alkalmazott QIAGEN® plazmid kit működése a különböző méretű DNS eltérő renaturációs sebességén alapul. NaOH és SDS denaturálja a DNS-t és a többi sejtalkotót (fehérjék, sejtmembrán), és amikor a savas pufferral helyreállítjuk a pH-t a DNS molekulák differenciálisan renaturálódni kezdenek: a plazmidok gyorsabban nyerik vissza natív formájukat, és a felülúszóban maradnak, míg a genomi DNS a csapadékba kerül a többi sejtalkotó molekulával együtt. Utána utótisztítást alkalmazunk, ami a csapadék szűréséből és kromatográfiás oszlop használatából áll. A kromatográfiás oszlop megköti a plazmid DNS-t, míg a szennyezés (főképpen poliszacharidok) a mosással távoznak. A sókoncentráció és a pH megváltoztatásával eluálódik a DNS. A DNS koncentrálását izopropanolos kicsapással végezzük. Ez a módszer eredetileg *Escherichia coli*-ra lett optimalizálva.

I.6. Next generation sequencing

A különböző next generation sequencing technikák elterjedése forradalmasította a DNS nukleotid sorrend meghatározást. Mind a költségek, mind a meghatározáshoz szükséges idő jelentősen csökkent. Ezek a módszerek a polimeráz reakción (454 FLX, Illumina, Ion Torrent) vagy ligáláson (Solid) alapulnak. Közös jellemzőjük, hogy kis méretű DNS fragmentumokat olvasnak le egyszerre, de abból párhuzamosan nagyon sokat. A beépült nukleotid meghatározásához, fényt kibocsátó kémiai reakciót (Illumina) vagy fluoreszkáló vegyülettel módosított bázisokat (Solid, 454 FLX) alkalmaznak. Ezekről eltérően az Ion Torrent módszer nem használ módosított bázisokat és egyéb vegyületet, hanem a bázis DNS láncba való beépülésekor felszabaduló protonok által okozott pH változás mérésén alapul. A pH változást a CMOS (Complementary Metal–Oxide–Semiconductor) alapú protonokra érzékeny félvezető szenzor méri. A szenzor felszínén 1,2 millió 3,5 μm átmérőjű és 3 μm mély üreg található, ennek az alján van a protonokra érzékeny tantál-oxid réteg (ISFET - ion-sensitive field-effect transistor). A DNS-t feldarabolják (50-100 bp) és adaptorhoz ligálják. Az így elkészült könyvtárat olyan 2 μm átmérőjű poliakrilamid gyöngyökhöz kötik, amikhez az adattal komplementer DNS van kötve, ami primerként szolgál majd a reakcióhoz. Ezt felamplifikálják emulzió PCR-rel. A DNS-t tartalmazó gyöngyöket az üregekbe töltik, egy üregbe csak egy gyöngy kerül. A gyöngyöket tartalmazó oldatban van DNS polimeráz és egy fajta dNTP (C, T, G vagy A). Ha közvetlenül primer mellett van komplementer bázis (egyszerre több is lehet) a templatként szolgáló szálon, akkor a bázis beépül a nascent szála. A nukleotid trifoszfát beépülésekor egy pirofoszfát és egy proton (H^+) szabadul fel. A felszabaduló proton által okozott pH változást (körülbelül pH 0,02) érzékeli a szenzor, a pH változás mértéke arányos a beépült bázisok mennyiségével. Ezt az elektróda arányos méretű elektromos jellé alakítja, melyből az elektromos rendszer digitális jelet képez (analóg/digitális konverter). Ha reakció lezajlott, a maradék dNTP-t kimossák és helyette egy másik dNTP-t tartalmazó reakció puffert adnak hozzá és a reakció kezdődik előlről. A hosszú homopolimer DNS szekvenálása problémát okozhat a rendszernek, mivel a beépülő nukleotidokkal arányosan változik a pH, és ez által az elektromos jel nagysága is. Ez egy bizonyos méret fölött problémát okozhat, a nukleotid sorrend meghatározásában. A rendszer előnye viszont a magas jel/zaj arány és az optikai érzékelő hiánya, tehát a mérés közvetlen. [45]

II. CÉLKITŰZÉSEK

A bacteroidesek opportunistá patogén tulajdonságai mellett keveset tudunk a kis és nagy plazmidjaik szerepéről. Genomiális szekvenálási projekteken 4 nagyobb plazmid jelenlétét mutatták ki a megszekvenált típus törzsekben. Laboratóriumunkban is a kis plazmidok izolálása során nagy plazmidok jelenlétére következtek. Ezek alapján a következő célokat tűztük ki:

- I. Összehasonlítani a genomiális szekvencia meghatározások során felfedett nagy plazmidok szekvenciáit rokonsági fokuk és evolúciójuk meghatározása céljából.
- II. Módszert találni nagy plazmidok kinyerésére *Bacteroides* törzsekből.
- III. Egy *Bacteroides* törzsgyűjtemény átvizsgálása nagy plazmid tartalom szempontjából.
- IV. A szekvenálási adatok és az azokból levont következtetések alapján vizsgálni az izolált plazmidok rokonságát.
- V. Az izolált plazmidok szerepére következtetni eredetük és szekvenciájuk alapján.

III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

III.1. Baktérium törzsek és tenyésztésük

A *Bacteroides* törzseket BHIS (BHI, Brain-Heart-Infusion tápoldat kiegészítve, 0,5% élesztő kivonattal, 5 mg/ml heminnel és 1 mg/l K₁ vitaminnal) tápoldatban, vagy anaerob véres agaron (Columbia agar, 5% defibrinált marhavér, 5% lizált marhavér, 0,12 g/l cisztein és 1mg/l K₁ vitamin) tenyésztettük anaerob körülményeket alkalmazva (85 % N₂, 10 % H₂ és 5 % CO₂), 37 °C-on, 48 órán keresztül. Az *Escherichia coli* törzseket Luria–Bertani (1 % LB, 1 % Tryptone, 0,5% Élesztő kivonat, 1% NaCl) tápoldatban vagy LB agaron tenyésztettük 37°C-on aerob körülmények között 24 órán keresztül.

A vizsgált *Bacteroides* törzseket klinikai mintákból izolálták laboratóriumunk munkatársai, vagy az irodalomban leírt kontroll törzsek voltak (2. Táblázat). A törzsek faj szintű azonosítása a rutin diagnosztikai módszereknek megfelelően történt. Használtam a következő *E. coli* V517 és R16173 (39R861) referencia törzseket plazmid méret megállapítása céljából (3. Táblázat).

2. Táblázat. A használt *Bacteroides* törzsek összesítve

Faj	Eredet/referencia	Szám
Laboratóriumunkban izolált törzsek		
<i>B. fragilis</i>	fertőzés	27
	normál flóra	4
<i>B. thetaiotaomicron</i>	fertőzés	1
<i>B. ovatus</i>	fertőzés	1
<i>B. uniformis</i>	fertőzés	1
Irodalmi kontroll törzsek		
<i>B. fragilis</i> NCTC 9343	-	
<i>B. ovatus</i> IB106	[35]	
<i>B. vulgatus</i> CLA341	[34]	

III.2. Plazmid izolálási módszer

A plazmidok bacteroidesekből való kivonásához QIAGEN® QIAfilter Plasmid Midi kitet alkalmaztunk. A *Bacteroides* törzseket 80 ml BHIS kultúrában növesztettük, míg az *E. coli* V517 és az R16173 törzseket ugyanannyi LB tápfolyadékban. A folyadék kultúrákat centrifugáltuk Janetzki K23 centrifugában 3000 rpm fordulatszámmal 20 percen keresztül, majd a felülúszót leöntöttük. A sejtpelletet felszuszpendáltuk 4ml P1 (50 mM Tris/HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNáz A) pufferben (4°C). Ezután 4 ml P2 (lízis) (200 nM NaOH, (1 %) 1 w/v % SDS) puffert adtunk hozzá, hogy egyenletesen kék színű legyen. Ez után 5 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten. Az inkubációs idő leteltével P3-as puffert (3,0 M K-acetát pH 5,5) adtunk hozzá. Az oldatot ezután átöntöttük a QIAfilter Midi szűrővel ellátott fecskendőbe, amit tíz percig állni hagytuk, hogy a csapadék elváljon a számunkra fontos plazmidot tartalmazó folyadéktól. Az inkubációs idő leteltével, a fecskendő tartalmát átjuttattuk QIAGEN ioncserélő oszlopba, ami egy kromatográfiás oszlop, amely képes megkötni a DNS-t. (Ezen a procedúrát megelőzően az oszlopot aktiváltuk a megadott pufferrel). Miután a minta átfolyt az oszlopon, 2×10 ml mosó pufferrel mostuk (QC), majd 5ml QF elúciós pufferrel a plazmid DNS-t eluáltuk. Ezután a DNS-t koncentráltuk 3,5ml izopropanollal, és az elegyből kicentrifugáltuk 20 percig 4 °C-on 3000 rpm-mel (Janetzki K23 centrifuga). A felülúszót leöntöttük, majd a DNS pelletet feloldottuk 200 µl TE pufferben (10 mM Tris/HCl pH 8,0, 1mM EDTA). A plazmid DNS koncentrációjának meghatározására UV spektrofotometriás mérést (260 és 280 nm), vagy az agaróz gélelektroforézisben adott szignált használtuk.

III.3. Restriktációs enzim emésztés és agaróz gélelektroforézis

A sejtekből kivont plazmid DNS mintákat *Bgl*III és *Hind*III restriktációs endonukleázokkal emésztettük. 200 ng plazmid mintához 2 µl, az enzim gyártója által megadott összetételű 10×puffert adtunk és 1 µl *Bgl*III (10u) vagy a 2µl *Hind*III (5u) enzimet 20 µl végtérfogatra adtunk. Az emésztési reakciót 150 percig inkubáltuk 37°C-on. Ezután az emésztett DNS kicsaptuk, 1/10 térfogat Na-acetátot (3 M, pH 4,8) és 2 térfogat 100 %-os etanolt adagolva. Ezután fél órát tároltunk jégen, majd centrifugáltuk (12000 rpm, 10 perc, 4°C). A felülúszót leöntöttük és a pelletet hagytuk megszáradni, majd feloldottuk 20 µl TE pufferben.

A hibridizációs próbát a *B. fragilis* NCTC 9343 (ATCC 25285) pBF9343 plazmidjának *DdeI* és *PstI* enzimekkel történő emésztésével készítettük. 300 ng DNS-hez 4 µl 10×puffert (NEB puffer III), 1-1 µl enzimet és 4 µl H₂O adtuk hozzá (40 µl végtérfogatra). Ezután 120 percre 37°C-on inkubáltuk, és a fentiekhez hasonlóan alkoholos kicsapást alkalmaztunk. Az emésztett plazmid DNS pelletet 22µl TE pufferben oldottuk.

Az agaróz gélelektroforézist 0,7%-os, 0,5×TBE-vel (45 mM Tris-borát, 2 mM EDTA, pH 8,2) készült, 0,5 µg/ml etidium-bromidot tartalmazó agaróz gélen végeztük, 5V/cm feszültség gradiens mellett, általában 12 cm hosszúságú géltálcában a nagyobb fokú elválasztás eléréséhez. A gélekről fotót készítettünk KODAK EDS250 CCD kamerával és a hozzá tartozó szoftverrel. Molekulasúly markerként lineáris (emésztett) DNS fragmentumokhoz lambda fág intakt DNS-t (48,5 kb) és 1 kb-os létra preparátumot (0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 5; 6; 8 és 10 kb, Fermentas) használtunk.

3. Táblázat. A használt *E. coli* referencia törzsek

<i>E. coli</i> ref. Törzs	Plazmidok mérete (kb)	referencia
V517	162; 56,4; 7,6; 5,7; 5,3; 4,2; 3,1; 2,7, 2,1	[42, 43]
R16173 (39R861)	154; 66,1; 37,6; 7,2	[44]

III.4. Southern transzfer, jelölt próba készítése és hibridizáció

III.4.1. Southern blot

A restrikciósan emésztett plazmidokat 0,7 %-os gélen elektroforetizáltuk, lefotóztuk, a felesleges részeket és a jobb alsó sarkot levágtuk, és a gélt megmértük. Depurinálás céljából először 0,25 M HCl-ban tartottuk a gélt 10 percig, majd denaturáló oldatba (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) helyeztük 25 percre, amely elválasztja a DNS kettős spirál szálait egymástól és a NaOH tartalma depurinálja azt (a depurinált DNS szálak darabokra törnek, ezáltal könnyebben transzferálhatóvá válnak). A gélt ezután a renaturáló oldatba (1 M Tris/HCl pH 7,4, 1,5 M NaCl) helyeztük 30 percre. Ezután a transzfer tornyot készítettük el. Alul egy edényben 10×SSC (20× SSC: 3 M NaCl, 0,3 M Na-citrát pH7) biztosította a folyadékáramlást és a DNS kötődését az alkalmazott filterhez (Hybond-N+, Amersham, UK). A gélre az SSC-ben megnedvesített filtert helyeztük, ezt kromatográfiás papírok (Whatmann 3M) közé raktuk,

erre papírtörülközőket helyeztünk. A rétegeket a tetejére helyezett súllyal nyomtuk össze. A transzferálást „overnight”, egy éjszakán át végeztük, és használat előtt a filterekhez irreverzibilisen kötöttük a DNS-t 80 °C-on való 90 perces inkubációval.

III.4.2. Jelölt próba készítése

250 ng emésztett DNS-t (pBF9343) 100°C-on, 5 percig denaturáltunk, majd ezután jégre (0°C) helyeztük 5 percre. A jelölés folyamata a „Gene Images AlkPhos Direct Labelling and Detection System” kemilumineszcens jelölő kittel történt a gyártó (GE Healthcare) által megadott összetételben és módon.

III.4.3. Hibridizáció

A hibridizációt hibridizációs kamrában (Model 2000, Robbins Scientific) végeztük a készülékhez adott hibridizációs üvegben a „Gene Images AlkPhos Direct Labelling and Detection System” kittel. Először a nylon filtert 55°C-on 15 percig prehibridizáltuk 50 ml hibridizációs oldattal (0,5 M NaCl, 4 % Blocking agent, 50 ml pre mix-ben). Ezután ráértük a jelölt próbát (50 µl) a filterre. A hibridizációt 55°C-on egész éjjel végeztük. Másnap a filtereket 55°C-ra előmelegített elsődleges mosó pufferrel (2 M Urea, 0,1% w/v SDS, 50 mM Na-foszfát pH 7,0, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 0,2% w/v Blocking reagent) mostuk 2×15 percen keresztül. Majd a hússzorosára hígított másodlagos mosó pufferrel (20×hígított, 1 M Tris bázis, 2 M NaCl), amihez 2 mM MgCl₂ adtunk előtte, 2×5 percen keresztül mostuk. Erre „Stringency washes”-ra azért volt szükség, hogy eltávolítsa a nem specifikusan kötődött próbát. A filter kivétele után CDP-StarTM reagenst adtunk hozzá és röntgen filmmel detektáltuk a hibridizált próba kemilumineszcens jelét.

III.5. Next Generation Sequencing

A Next Generation Sequencing kísérleteket MTA SZBK Genomikai kutatócsoportjában végeztek Ion Torrent platform szekvenálással (LifeTEchnologies), a leolvasott read-eket a CLC Genomics Workbench 4 szoftverrel rendezték és analizálták.

IV. EREDMÉNYEK

IV.1. Szekvenált nagy *Bacteroides* plazmidok összehasonlítása

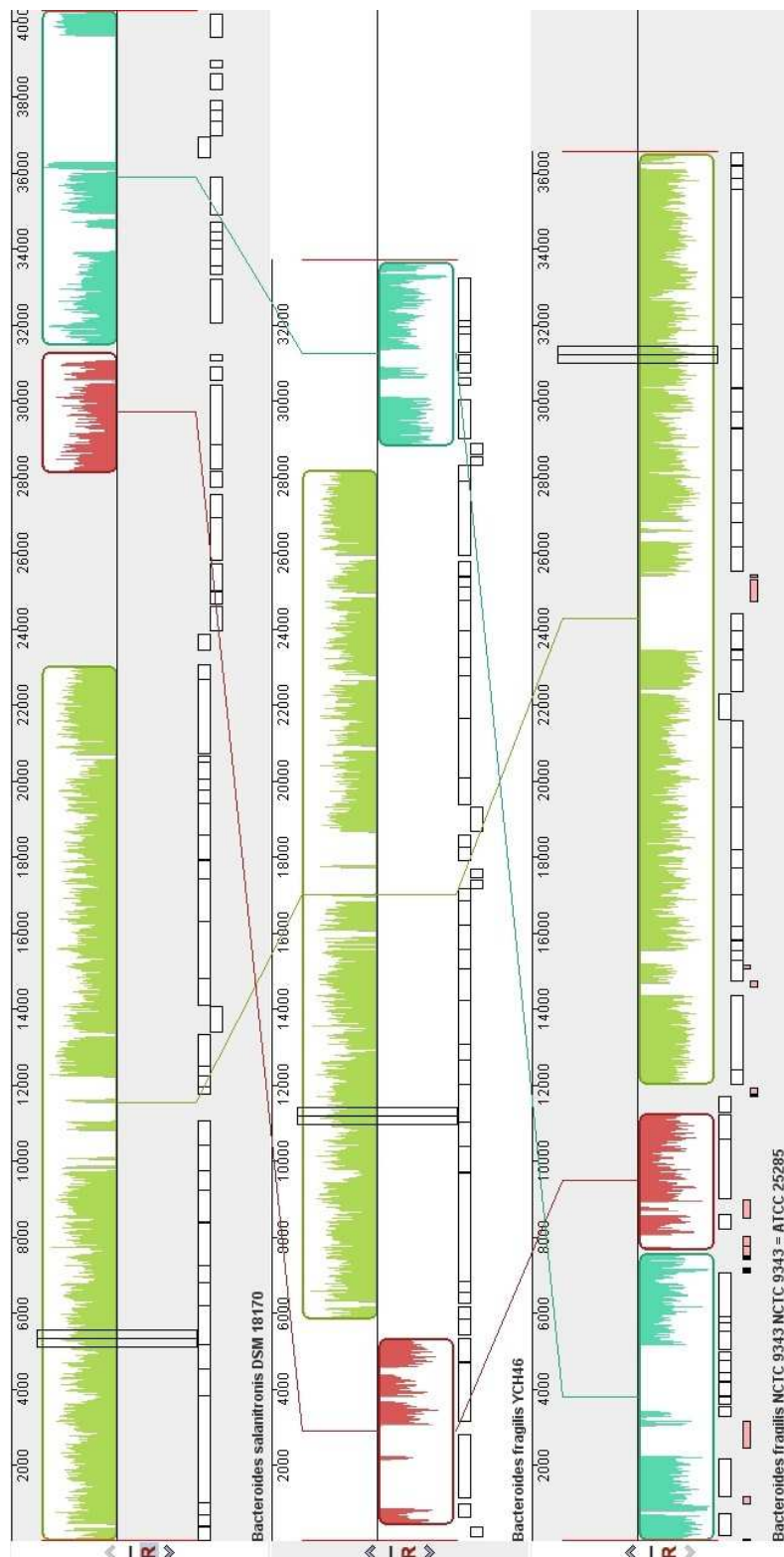
Laboratóriumunkban a *Bacteroides* kis molekulatömegű plazmidok tanulmányozásakor nagyobb plazmidok jelenléte volt sejthető több törzsben. Ugyanakkor számos nagy molekulatömegű plazmid szekvenciáját ismerjük a genomiális szekvenáló projektek eredményeiből (1. Táblázat). Célul tűztük ki további kísérletek kivitelezése előtt, hogy az ismert szekvenciájú nagy plazmidok homológia viszonyait feltérképezzük.

Az adatok analízise azt mutatta, hogy a négy nagyobb plazmid (1. Táblázat) közül háromnak (pBF9343, pYCH46 és pBACSA01) a „backbone” szekvenciájában nagy fokú hasonlóságok tapasztalhatók, amelyek három variábilisen elhelyezkedő szegmensben voltak megtalálhatók (1. ábra). A kimaradó *B. thetaiotaomicron* pBT5482 plazmid csak igen kis részben mutatott homológiát a fenti három plazmidhoz (2. ábra).

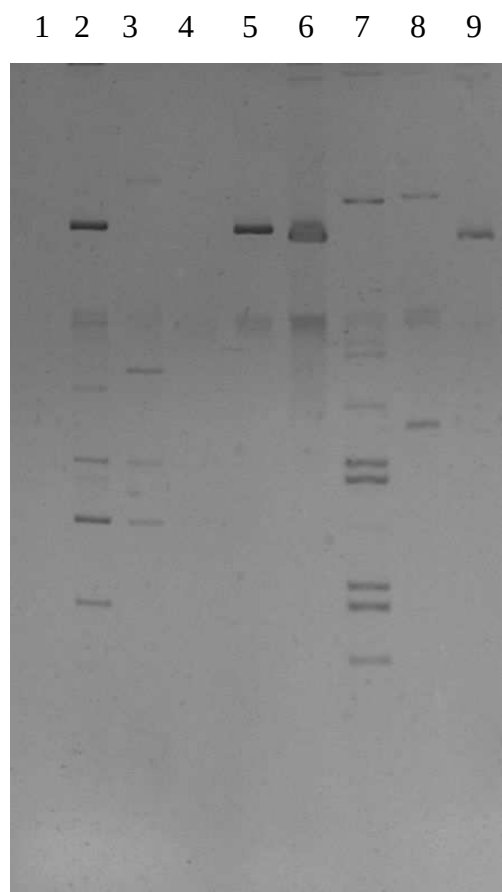
IV.2. Plazmid izolálási kísérleteink

Sikeresen alkalmaztuk a QIAGEN módszerét nagyméretű plazmidok kimutatására (2. ábra), ezt bizonyítja, hogy a referencia plazmidot (pBF9343, 36,5 kb) minden alkalommal sikerült izolálnunk, valamint sikerült izolálnunk egészen nagy méretű, 150 kb-nál nagyobb plazmidokat is. Kimutathatók a kovalensen zárt cirkuláris (ccc) és az open cirkuláris (oc) plazmidok, főleg a kis méretű plazmidoknál. 34 laboratóriumunkban izolált és 3 referencia *Bacteroides* törzsből végeztük a nagyméretű plazmidok izolálását (3. Táblázat). 8 (21,6%) esetben jártunk sikerrel és 11 nagyméretű plazmidot sikerült kimutatnunk, törzsenként egyet vagy 3 esetben kettőt.

A plazmidok mérete 18 és 180 kb közé esett. A fertőzésből származó (27 izolátum) *B. fragilis* törzsekből 5 esetben (18,5%), míg a normál flórából (4 izolátum) származó törzseknél 2 esetben (50%) sikerült plazmidot kimutatnunk. Sikerült kimutatnunk egy 37,5 kb méretű plazmidot, *B. thetaiotaomicron*-ból. A normál flórából származó *B. fragilis* 86774/2 és a fertőzésből származó *B. fragilis* P35 törzsben egy-egy azonos tömegű plazmidot (72 kb) mutattunk ki.



1. Ábra. A plazmidok összehasonlító homológiai képe. A zöld, piros és kék (ciánkék) színek az egymással homológ régiókat jelölik, a vonalak kiterjedése, pedig a homológia százalékos szintjét. A *B. salanitronis* DSM 18170 a pBACSA01, a *B. fragilis* YCH46 a pYCH46 és a *B. fragilis* NCTC9343 a pBF9343 plazmidokat tartalmazza.



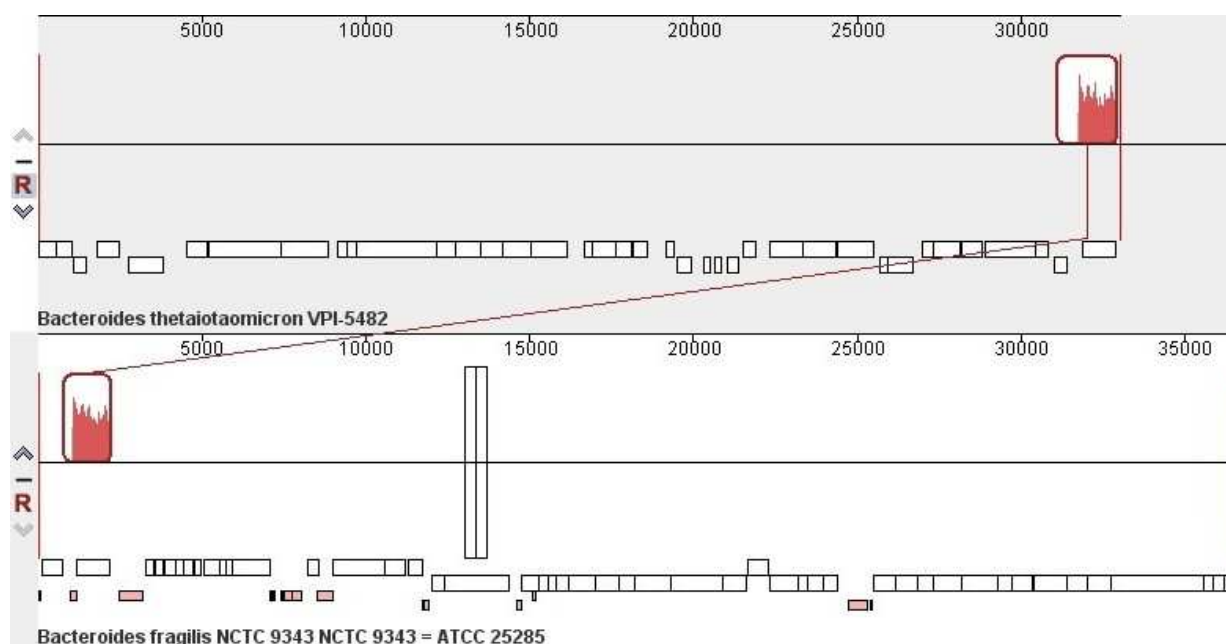
2. Ábra. A nagy molekulatömegű *Bacteroides* plazmidok izolálására és elektroforézisére példa. 1-9 oszlop: *B. ovatus* E137, *B. fragilis* 76240, 86774/2, 67277, NTCT9343, 86735/2, *E. coli* V517, R16173, *B. thetaiotaomicron* E414.

IV.3. Homológia vizsgálat

Az *in silico* plazmid összehasonlítás és a plazmid izolálási kísérleteink eredményei szerint a többféle izolált nagy plazmid egymás közötti és a referencia plazmidhoz viszonyított homológiájának tanulmányozása kézenfekvő volt. Ezt Southern blotting kísérletekkel kívántuk kivitelezni a pBF9343 plazmidot próbaként alkalmazva. (A próba, pBF9343, nagy intakt mérete miatt a jelölés és hibridizáció hatékonysága érdekében a plazmidot *DdeI* és *PstI* enzimekkel emésztettük. Így a plazmid nagy része ca. 200 és 1000 bp-os fragmentekre hasadt.) 11 nagy plazmidot hordozó preparátum plazmidjait *BglII* és *HindIII* enzimekkel emésztettük, és elvégeztük a hibridizációs kísérletet. Előzőleg a három homológ és szekvenált plazmid szekvenciáját elemeztük, hogy mely restriktációs enzimek adják a plazmidok fajonkénti legtöbb kimutatásra alkalmas restriktációs fragmentumait. Ezek a *BglII* és *HindIII* enzimek voltak.

3. Táblázat. A kísérleteinkben izolált nagy és kis plazmidok és becsült méretük kb-ban.

Faj	Törzs	Származás	Kis plazmid	Nagy plazmid
<i>B. fragilis</i>	21216	fertőzés	-	-
	19055		-	-
	55475		-	18
	CZE60		5,6	-
	16997		-	-
	14285		-	-
	15361		4,2; 5,6	44
	15472		2,7	-
	P35		5,6	72
	19686		-	-
	20127		4,2; 5,6	-
	25341		-	-
	6857/4		5,6	-
	22317		5,6	-
	BF8		-	-
	45416		4,2; 5,6; 8-10	-
	67277		-	-
	72357		-	-
	76240		2,7; 4,2; 5,6;10	39; 154
	71928		5,6; 8	-
	6269		-	-
	2761		-	-
	13422		4,2; 8; 11	68; 180
	21217		5,6	-
	16820		4,2	-
	52985		-	-
	8887		4,2; 5,6	-
	86774/2	Normál flóra	4,2; 5,6; 10	72
	86735		-	35; 150
	89413/3		-	-
	87680/1		-	-
<i>B. thetaiotaomicron</i>	E414	Fertőzés	-	37,5
<i>B. ovatus</i>	E137		-	-
<i>B. uniformis</i>	14291/2	Referencia	-	-
<i>B. fragilis</i>	NCTC 9343		-	36,5; 154
<i>B. ovatus</i>	IB106		-	46
<i>B. vulgatus</i>	CLA341		2,7; 4,2; 8,6	150



3. Ábra. A pBF9343 plazmidhoz nagyobb fokú homológiát nem mutató pBT5482 plazmid.

A törzsek, amikből a vizsgált plazmidok származtak: *B. fragilis* 55475, 15361, P35, 76240, 86774/2, 86735, 13422, NCTC 9343, *B. ovatus* IB106, *B. thetaiotaomicron* E414 és a *B. vulgatus* CLA341. A pBF9343, a *B. ovatus* IB106 és a *B. fragilis* 76240 törzsekben lévő plazmidokkal mutatott erős homológiát, míg a *B. fragilis* P35, 13422, és a *B. vulgatus* CLA341-el gyengén. Egyáltalán nem mutatott homológiát a *B. fragilis* 55475, 15361, 86735/2, és a *B. thetaiotaomicron* E414 plazmidjaival. pBF9343 plazmid BglII általi *in silico* emésztés fragmentumaiknak mérete (bp): 1514, 35046. A HindIII-mali *in silico* emésztés fragmentumainak mérete (bp): 471, 2215, 2549, 3458, 9232, 9285, 9329

4. Táblázat. HindIII emésztéssel kapott hibridizáló fragmentumok és becsült méretük.

Faj	Törzs	Fragmentméret (kb)
<i>B. fragilis</i>	P35	9,3; 6,9
<i>B. ovatus</i>	IB106	9; 4,3; 3,5; 3,3; 3,1; 2,2; 2,0; 1,95; 1,9; 1,6
<i>B. fragilis</i>	76240	9; 4,2; 3,5; 2,6; 2,2; 2,0; 1,95; 1,9; 1,6
<i>B. fragilis</i>	NCTC 9343	9; 3,5; 2,9; 2,2; 1,95
<i>B. vulgatus</i>	CLA341	9,36
<i>B. fragilis</i>	13422	12,2

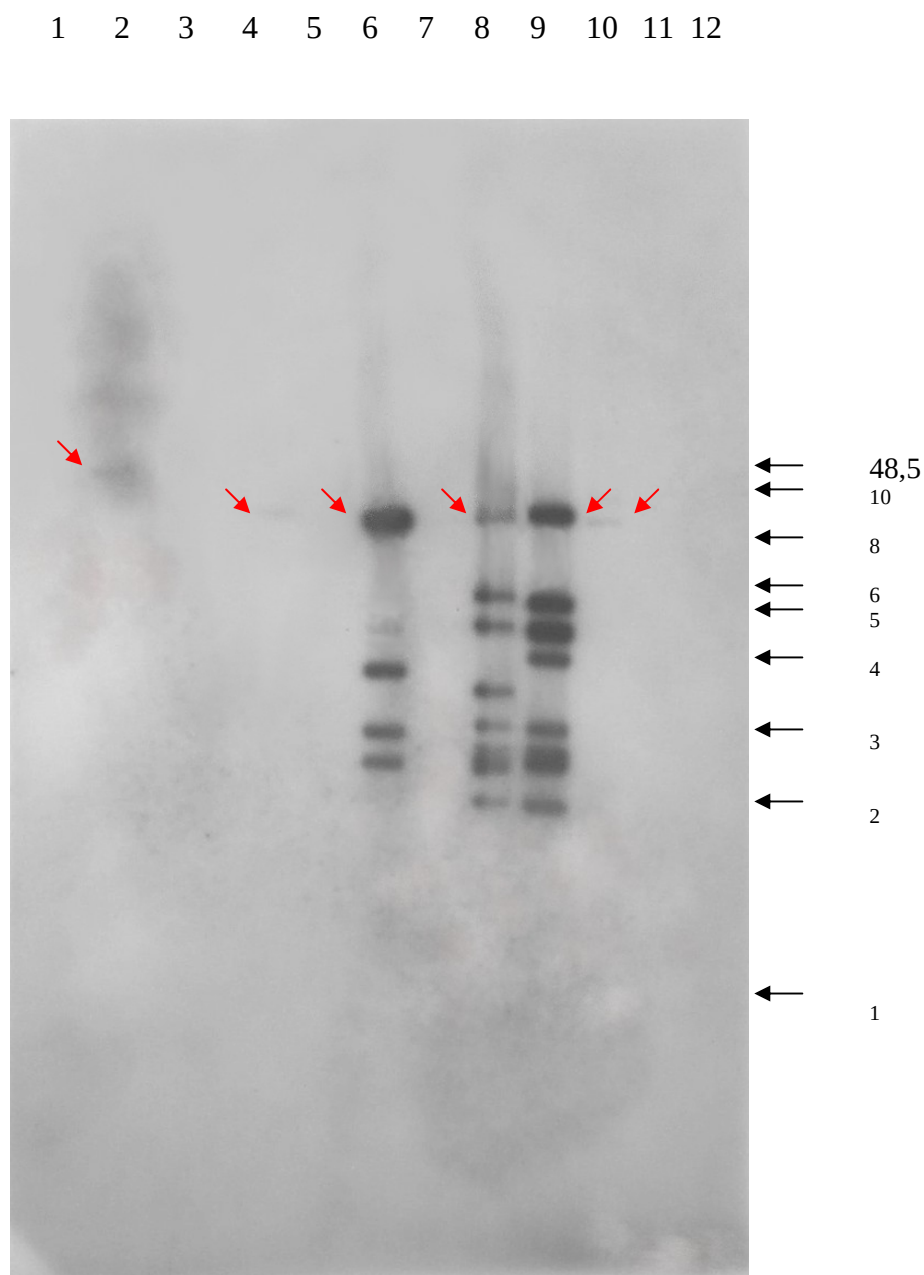
5. Táblázat. *Bgl*III emésztéssel kapott hibridizáló és becsült méretük.

Faj	Törzs	Fragmentméret (kb)
<i>B. ovatus</i>	IB106	(638); 36
<i>B. fragilis</i>	76240	(416); 36
<i>B. fragilis</i>	NCTC 9343	36
<i>B. vulgatus</i>	CLA341	15,5
<i>B. fragilis</i>	13422	1,8

Az pBF9343 plazmid önmagával történő hibridizációja során sikerült azonosítanunk a *Hind*III emésztésnél várt fragmentumokat, a három legnagyobb fragmentum egyetlen ~9 kb méretű bandként látszik (4. Táblázat, 4. Ábra). A pBF9343 kontroll plazmid *Bgl*III-vel történt emésztése és a hibridizáció után azonosítani tudtuk a nagyobbik fragmentumot (36 kb, 5. Táblázat). A három erős homológiát mutató törzsnek (*B. fragilis* 76240, NCTC 9343 és a *B. ovatus* IB106) igen hasonló a *Bgl*III (5. Táblázat) és a *Hind*III (4. Táblázat, 4. Ábra) restrikciós fragmentum mintázata. A *Bgl*III restrikciós mintázatban sikerült azonosítanunk mind három törzsben egy azonos nagy (36 kb) méretű fragmentumot. Valamint *Hind*III restrikciós endonukleázzal kapott fragmentumok mérete is hasonló volt, bár méretbeli polimorfizmust mutattak. A 9 kb, 3,5 kb, 2,2 kb és a 2,0 kb méretű fragment megtalálható mindhárom törzs plazmidjának fragmentjei között. Az *B. ovatus* IB106 és *B. fragilis* 76240 hasonló méretű fragmentumai pedig az eddigieken kívül a 4,2-4,3 kb, 2,0 kb, 1,9 kb, 1,6 kb méretűek, ebből következik, hogy ennek a két törzsnek a plazmidjai nemcsak a hibridizációs szerint mutatnak erős homológiát, hanem a restrikciós hasítás szintjén is. A gyenge homológiát mutató *B. vulgatus* CLA341 azonos méretű fragmentumja a *B. fragilis* NCTC 9343-mel és a 76240-nel, pedig 7,6 kb méretű. A *B. ovatus* IB106 és a *B. fragilis* 76240 egy-egy nagyméretű fragmentumjának nem sikerült meghatároznunk a méretét extrapolációs problémák miatt. A *B. fragilis* P35 törzsnek a homológ fragmentjet csak *Hind*III enzimes emésztéssel készült hibridizációnál volt észlelhető.

IV.4. Kiválasztott törzsek plazmid mintáinak szekvenálása

Az erős homológia és a referencia plazmidhoz hasonló méret (39 kb) alapján választottuk ki nukleotid szekvenálásra a *B. fragilis* 76240 törzs plazmidját, valamint kiválasztottuk a *B. fragilis* 13422 törzs kevésbé homológ és különböző méretű plazmidját (68 kb). Ezen felül, mind a két törzs tartalmazott kis plazmidokat és egy-egy 150 kb méret körüli igen nagy méretű plazmidot, amelynek természetére szintén kíváncsiak voltunk (3. Táblázat).



4. Ábra. A *HindIII* restrikciós enzimmal emésztett plazmidok homológia vizsgálata. Reagáló minták nyíllal jelölve. Törzsek sorrendje 1-12: *B. ovatus* E137, *B. fragilis* 13422, *B. thetaiotaomicron* E414, *B. vulgatus* CLA341, *B. fragilis* 86735, NCTC9343, 86774/2, 76240, *B. ovatus* IB106, *B. fragilis* P35, 15361, 55475. M: lineáris molekulaszúly marker (a fő bandek a jobb oldalon jelezve, és a méretük kb-ban megadva)

Ion Torrent alapú szekvenálási módszerrel, az SZBK Genomikai Kutatócsoportjában elvégezték a kiválasztott két minta szekvencia meghatározását és analízisét. Kb. 200 bp-os átlagos leolvasási hosszok mellett 279000 és 457000 leolvasást generáltak, és kontigokba rendezték a leolvasásokat. A *B. fragilis* 13422 esetén a valószínűsített 68 kb-os nagy plazmid szekvenciájára adatokat nyertünk, a kontigok homológiai viszonyait BLAST összehasonlításokkal tisztáztuk (Függelék, F1. Táblázat). Ezekből az adatokból a többi plazmid szekvenciájára is következtetni tudtunk, így megtaláltuk a 4,2 kb-os plazmid (pLV22a) már ismert mobilizációs régióját. A *B. fragilis* 76240 esetén hasonló eredményeket kaptunk. Megtaláltuk az pBF9343 plazmidhoz hasonló nagy plazmid szekvenciáját, és az 5,6 kb-os plazmidra (pBFP35) utaló szekvencia adatokat is. Ennek a törzsnek a 39 kb-os plazmidja a hibridizációs kísérletekben is homológnak bizonyult. A két *B. fragilis* törzs kisméretű plazmidjainak kontigjait sikerült összerendezni melyeknek az adatait a 6. Táblázat tartalmazza. A BLAST program a *B. fragilis* 76240 törzs 2740 bp plazmidjának 99%-os nukleotid egyezését mutatta ki a pBI143-al, a 5592 bp méretű plazmidjánál szintén 99%-os megegyezést mutatott ki az ismert szekvenciájú pBFP35 plazmiddal. A 4135 kb méretű plazmid pedig 99%-os megegyezést mutatott a pLV22a plazmid ismert szekvencia részleteivel. Ez a három plazmid azonosnak tekinthető az ismert szekvenciájú megfelelőikkel. A *B. fragilis* 13422 törzs 4136 bp méretű plazmidjának csak egy 1372 bp-os szegmense egyezett a pLV22a ismert szekvencia részleteivel (nem teljesen azonos a *B. fragilis* 76240 szinte bázispárra azonos méretű plazmidjával), a 10166 bp méretű plazmidja pedig a pBACSA03 plazmiddal mutatott 46%-os megegyezést. A 10166 bp méretű plazmidon a mobilizációs és a replikációs proteineken kívül tartalmaz egy béta-laktamáz és egy Cytochrome c551 peroxidáz (feltételezett funkciójú) gént. A 4136 bp méretű plazmid egy *Txe/YoeB* toxin génen és mobilizációhoz szükséges géneken kívül csak hipotetikus proteineket tartalmaz.

6. Táblázat. A két *B. fragilis* törzs kis méretű plazmidjainak adatai.

Törzs	Plazmid mérete (bp)	ORF-ek száma
76240	5592	8
	4135	8
	2746	3
13422	10166	15
	4136	9

V. MEGBESZÉLÉS

A QIAGEN® QIAfilter Plasmid Midi kitet sikerrel alkalmaztuk nagyméretű plazmidok kimutatására, ezt bizonyítja, hogy a *B. fragilis* NCTC9343 törzsből származó referencia plazmidot (pBF9343, 36,5 kb) minden alkalommal sikerült izolálnunk, valamint sikerült izolálnunk egészen nagy méretű, 150 kb-nál nagyobb plazmidokat is. A módszer azonban hagyott kívánnivalókat maga után, ugyanis maradt vissza genomi szennyezés. A módszer specificitása esetleg fokozható lehetne hőmérséklet emeléssel, mint a Kado-Liu [12] és Zöllner [11] módszerek esetén. Ahol is alacsony lúg koncentráció mellett magas hőmérséklet segíti a plazmidok és a kromoszóma differenciális denaturációját.

A fertőzésekből izolált *B. fragilis*ek 51%-ában mutattunk ki kis méretű plazmidokat, míg a normál flórából származó törzsek esetében 25%-ban. A fertőzésekből izolált törzsekben a leggyakoribb kis méretű plazmid az 5,6 kb (ClassIII) plazmid volt 40,7%-os előfordulással, ezt követi a 4,2 kb (ClassII) plazmid 22%-kal és a 2,7 kb (ClassI) plazmid 7,4%-kal. Ezen törzsek 14,6%-ban tartalmaztak egyéb kis (8-11 kb) méretű plazmidokat. A normál flórából származó törzsek 25%-ában mutattunk ki kis méretű plazmidokat, 4 törzsből az egyikben (2,7 kb, 4,2 kb, és 8,6 kb). Ezekből az adatokból nem lehet következtetni arra, hogy a kis méretű plazmidoknak van-e szignifikánsan köze a virulenciához, 27 fertőzésből izolált törzs áll szemben 4 normálflórából izolálttal. Viszont a fertőzésből izolált törzseknél a kis méretű plazmidoknak az eloszlása a szakirodalomban leírtakhoz hasonló volt. A *B. vulgatus* CLA341-ben megtaláltunk a leírt kis méretű plazmidokat (2,7 kb, 4,2 kb és 8,6 kb). A ismert szekvenciájú ClassI és II plazmidok kriptikusak, de a ClassIII pBFP35-ön feltételeznek egy lipoprotein gént, amelynek virulenciában betöltött szerepe vizsgálat alatt van.

A törzsek 21,6%-ában sikerült kimutatnunk nagyméretű plazmidokat, változatos méreteken. Ugyanekkor több hasonló méretűt találtunk, két 72 kb körül a *B. fragilis* 86774/2-ben és a P35-ben. Valamint *B. fragilis* 76240-ben egy a *B. fragilis* NTCT 9343 plazmidjával erősen homológ és hasonló méretű plazmid található. Három esetben sikerült igen nagyméretű plazmidokat, 150 kb méretűnél nagyobbakat kimutatnunk (3. Táblázat), ezeknél azonban nem tisztázott, hogy valóban plazmidok vagy esetleg kivágódó kromoszóma részek. A Southern blot kimutatta, hogy ezek részben homológok (erősen vagy gyengén) a pBF9343 plazmiddal. Három törzs plazmidjait találtunk erősen homológoknak a pBF9343 plazmiddal, ezek a *B. fragilis* 76240, NCTC 9343 és a *B. ovatus* IB106, gyengén homológoknak a *B. fragilis* P35, 13422, és a *B. vulgatus* CLA341. A hibridizációs restrikciós fragmentum

mintázatuk ezeknek a plazmidoknak nagyfokú hasonlóságot mutatott, de nem teljes egyezést, ami kisfokú szekvencia variabilitásra utal. A régebben megszekvenált nagyméretű plazmidok esetében elvégeztük a *in silico* összehasonlítást, amely szintén a homológia (ca. 70 %) mellett variabilitásra utalt. Kérdés a nagyméretű *Bacteroides* plazmidok csoportosítása, amely szintén elvégzendő feladat lenne a kis méretű plazmidokhoz hasonlóan. A hibridizáció stringenciája (> 95 %) miatt azonban csak az erős homológiát mutató plazmidokat tudtuk detektálni. Itt az *in silico* eredményeknél erősebb rokonságról lehet szó. Lehetséges, hogy a pYCH46 és a pBSAC01 plazmidok erős homológjait nem tudtuk volna detektálni. Ezek plazmidok japán eredetűek, előfordulásuk kérdéses lehet a magyar törzsek körében. De lehetséges, hogy az egyéb 30-40 kb-os plazmidok (pl.: *B. fragilis* 15361, 86735 és *B. thetaiotaomicron* E414) ez utóbbi két referencia plazmid csoportjába tartozik.

Az erős homológia, és a referenciá plazmidhoz hasonló méret (39kb) alapján választottuk ki szekvenálásra a *B. fragilis* 76240 törzs plazmidját, valamint kiválasztottunk *B. fragilis* 13422 törzs kevésbé homológ és különböző méretű plazmidját (68kb). A szekvenálás nyers eredményei előzetes kísérleteinket és az eddigi ismereteinket igazolták. Azonosíthatóak voltak a ClassI, II és III plazmidok megfelelő tagjai a szekvenált plazmidok között. A mapping eredmények a pFP9343 homológjaként azonosították a *B. fragilis* 76240 39 kb-os plazmidját a hibridizálási kísérletekkel egyezően. A *B. fragilis* 13422 esetén a 68 kb-os plazmid valószínűleg új osztályt képvisel. A kisméretű plazmidok szekvenciáinak összerendezése után, megállapítottuk, hogy a *B. fragilis* 76240 az ismert szekvenciájú pFBP35-tel, a pBI143-al és részben ismert szekvenciájú pLV422-vel lényegében azonos plazmidokat hordoz. A *B. fragilis* 13422 két kisméretű plazmidja pedig új típusok és kisebb hasonlóságot mutatnak ismert szekvenciájú plazmidokkal. Az egyiken található egy béta-laktamáz és egy peroxidáz gén (feltételezett funkciójuk).

Célkitűzéseinknek megfelelően felmértük a hazai *Bacteroides* izolátumok körében a nagy molekulatömegű plazmidok előfordulását és homológia viszonyait. Két törzs esetében Next Generation Sequencing módszerrel elkezdtuk a plazmidok szekvencia meghatározását és analízisét, amely egyelőre nem teljes, de befejezését tervezzük. Az azonosított plazmid típusok (kis és nagy molekulatömegű egyaránt) jelenléte nem volt korreláltható a klinikai eredettel. A továbbiakban több normál flóra eredetű törzset kellene megvizsgálni.

VI. TARTALMI ÖSSZEFOGLALÓ

Az egyik leggazdagabb ismert mikrobiális életközösséget a humán béltraktus rejti, legalább 500-1000 faj 7000 törzsét tartalmazhatja, amelyek főként Bacteroidetes és Firmicutes fajok. A leggyakoribbak, körülbelül 30%, a *Bacteroides* (Gram negatív, anaerob) nemzetségbe tartoznak. Ez a nemzetség fontos szimbionta és kommenzalista a bélcsatornában, de megfelelő körülmények esetén fajai opportunistá patogénként is viselkedhetnek. Leggyakoribbak pleuropulmonáris, intraabdominális, női genitális traktus és bőr, kötőszövet és csontszöveti fertőzésekben. A két leggyakoribb patogén faj a *B. fragilis* (60%) és a *B. thetaiotaomicron*. Számos patogenitási faktorral rendelkeznek, amelyek a gazda anyagait bontani képes enzimek (pl.: kollagenáz), poliszacharid tok, a lipopoliszacharid, antibiotikum rezisztencia gének és a *B. fragilis* törzsek által változó mennyiségben termelt enterotoxin. Ebben a nemzetségben és rokonságában igen elterjedtek és változatosak a különböző mobilis genetikai elemek. Ilyenek az inszerciós szekvencia elemek, mobilizálható és konjugatív plazmidok, transzpozonok, mobilizálható és konjugatív transzpozonok, melyek hozzájárulhatnak az antibiotikum rezisztencia gének terjedéséhez, vagy a genomba beékelődve fokozhatják bizonyos gének működését. A plazmidok két méretbeli osztályra oszthatók, kis (2,7 kb-11 kb) és nagy méretűekre (>11 kb). A kisméretű plazmidok a leggyakoribbak, nagyrészüket 3 homológia csoportba sorolható (Class I-III; 2,7; 4,2; 5,6 kb), ezek nagyrészt kriptikusnak tekinthetők. A dolgozatban kifejezetten a nagyméretű plazmidokra koncentráltunk. Célunk a már ismert szekvenciájú plazmidok rokonsági fokának megállapítása és evolúciójuk feltárása, nagyméretű plazmidok izolálásához megfelelő módszer keresése, a laboratóriumunk törzsgyűjteményének átvizsgálása nagy méretű plazmid tartalom szempontjából volt. Ezen felül, következtetni kívántunk izolált plazmidok szerepére eredetük és szekvenciájuk alapján. Vizsgálataink során 11 nagy méretű plazmidot sikerült kimutatni 34 a laborunkban izolált törzsből, változatos mérettartományban (18-178 kb). Restriktív emésztés (*Bgl*III és *Hind*III) és Southern blot segítségével kimutattunk a *B. fragilis* NCTC 9343 plazmidjával (pBF9343, amelyet genomális szekvenálás projektekben ismertek fel) 2 erős (39 és 46 kb), és 3 gyenge homológ plazmidot, melyek közül kettőt kiválasztottunk szekvenálásra. A szekvenálás az eredeti elképzeléseinket igazolta, és tovább folytatandó a teljes szekvencia meghatározására, és a plazmidok szerepének tisztázására.

VII. IRODALOMJEGYZÉK

1. **Shah, H. N., Jacinto, R. C., Ahmod, N., Langham, S., Gharbia, S. E., Kallow, W. and Welker, M.** (2008) The Genus *Bacteroides*. In: Encyclopedia of life science (ELS). John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.
2. **Sóki, J., Wareham, D. W., Rátkai, C., Aduse-Opoku, J., Urbán E., Nagy E.** (2010). Prevalence, nucleotide sequence and expression studies of two proteins of a 5.6 kb, Class III, *Bacteroides* plasmid frequently found in clinical isolates from European countries. Plasmid **63**: 86–97.
3. **Sóki J., Szőke I and Nagy E.**, (1999). Characterisation of a 5.5-kb cryptic plasmid present in different isolates of *Bacteroides* spp. originating from Hungary. J. Med. Microbiol. **48**:25-31
4. **Wexler, H. M.**, (2007). *Bacteroides*: the Good, the Bad, and the Nitty-Gritty. Clinical Microbiology Reviews, Clin. Microbiol. Rev. **20**(4): 593-621
5. **Wang Y., Rotman E. R., Shoemaker, N. B., and Salyers, A. A.** (2007). Translational Control of Tetracycline Resistance and Conjugation in the *Bacteroides* Conjugative Transposon CTnDOT. J. Bacteriol., **187**(8):2673.
6. **Salyers, A. A., Shoemaker, N. B., and Li, L. Y.** (1995). In the driver's seat: the *Bacteroides* conjugative transposons and the elements they mobilize. J. Bacteriol., **177**(20):5727.
7. **Wang, Y., Rotman, E. R., Nadja B. Shoemaker and Abigail A. Salyers**, (2005). Translational control of tetracycline resistance and conjugation in the *Bacteroides* conjugative transposon CTnDOT. J. Bacteriol., **187**(8):2673.
8. **Whittle, G., Shoemaker, N. B., and Salyers, A. A.** (2002). The role of *Bacteroides* conjugative transposons in the dissemination of antibiotic resistance genes. CMLS, Cell. Mol. Life Sci. **59**: 2044–2054
9. **Shoemake, N. B., Salyers, A. A., Jeters, R. T., Wang, G.-R., and Moon, K.**, 2009. Tetracycline-associated transcriptional regulation of transfer genes of the *Bacteroides* Conjugative Transposon CTnDOT. J. Bacteriol. 2009, **191**(20): 6374.
10. **Speer, B. S., Bedzyk, L. and Salyers, A. A.** (1991). Evidence that a novel tetracycline resistance gene found on two *Bacteroides* transposons encodes an NADP-requiring oxidoreductase. J. Bacteriol., **173**(1): 176.

11. **Zöllner, E. J., von Eichel-Streiber, C, Schwinndling, F.-P.** (1983) Isolation and purification of plasmids from *Bacteroides fragilis* using rubidium trichloroacetate density gradient centrifugation. *Mol. Gen. Genet.* **189**: 169-171.
12. **Kado, C. I., Liu, S.-T.** (1981) Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* **145**(3): 1365-1373.
13. **Smith, C. J., Rollins L. A., And Parker, A. C.** (1995) Nucleotide sequence determination and genetic analysis of the *Bacteroides* plasmid, pBI143. *Plasmid* **34**: 211–222.
14. **Xu, J. et al.** (2003) A genomic view of the human-*Bacteroides thetaiotaomicron*. *Science* **299**: 2074-2076.
15. **Smillie, C., Garcillán-Barcia, M. P., Francia, M. V., Rocha, E P. C., and de la Cruz, F.** (2010). Mobility of plasmids. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **74**(3): 434-452.
16. **Holton, J** (2008) Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* *Current Infectious Disease Reports* **10**: 99–104.
17. **Salyers, A. A., Gupta, A. and Wang, Y.** (2004) Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes **12**(9): 412-416.
18. **Comstock, L. E. and Coyne M. J.** (2003) *Bacteroides thetaiotaomicron*: *Bacteroides thetaiotaomicron*: a dynamic, niche-adapted human symbiont. *BioEssays* **25**: 926–929.
19. **C. J. Smith, C. J., G. D. Tribble, G. D., and Bayley, D. P.** (1998) Genetic elements of *Bacteroides* species: a moving story. *Plasmid* **40**: 12–29
20. **Sóki, J., Gal, M., Brazier, J. S., Rotimi, V. O., Urbán, E., Nagy, E., and Duerden, B. I.** (2006) Molecular investigation of genetic elements contributing to metronidazole resistance in *Bacteroides* strains. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **57**: 212–220.
21. **Tribble, G. D., Parker, A. C., and Smith, C. J.** (1999) Transposition genes of the *Bacteroides* mobilizable transposon Tn4555: role of a novel targeting gene. *Molecular Microbiology* **34**(2): 385-394.
22. **Nikolich, M. P., Shoemaker, N. B., and Salyers, A. A.** (1992) A *Bacteroides* tetracycline resistance gene represents a new class of ribosome protection tetracycline resistance. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, **36**(5): 1005-1012.
23. **Hwa, V., N B Shoemaker, N. B. and Salyers, A. A.** (1988) Direct repeats flanking the *Bacteroides* transposon Tn4351 are insertion sequence elements. *J. Bacteriol.* **170**(1):449.

24. **Li, L. Y., Shoemaker, N. B., and Salyers, A. A.** (1993) Characterization of the mobilization region of a *Bacteroides* insertion element (NBU1) that is excised and transferred by *Bacteroides* conjugative transposons. *J. Bacteriol* 175(20): 6588-6598
25. **Smith, C. J., and Parker A. C.** (1993) Identification of a circular intermediate in the transfer and transposition of Tn4555, a mobilizable transposon from *Bacteroides* spp. *J. Bacteriol.* 175(9): 2682.
26. **Tribble, G. D., Parker, A. C. and Smith, C. J.** (1997) The *Bacteroides* mobilizable transposon Tn4555 integrates by a site-specific recombination mechanism similar to that of the gram-positive bacterial element Tn916. *J. Bacteriol.* 179(8): 2731.
27. **Smith, C. J. and Parker, A. C.** (1998) The transfer origin for *Bacteroides* mobilizable transposon Tn 4555 is related to a plasmid family from gram-positive bacteria *J. Bacteriol.* 180(2):435.
28. **Cheng, Q., Paszkiet, B. J., Shoemaker N. B., Gardner, J. F., and Salyers, A. A.** (2000) Integration and excision of a *Bacteroides* conjugative transposon, CTnDOT *J. Bacteriol.* 182(14): 4035.
29. **Tribble, G. D., Parker, A. C., and Smith, C. J.** (1999) Genetic structure and transcriptional analysis of a mobilizable, antibiotic resistance transposon from *Bacteroides*. *Plasmid* 42: 1–12.
30. **Gronow, S. et Al** (2011) Complete genome sequence of *Bacteroides salanitronis* type strain (BL78T). *Standards in Genomic Sciences* 4: 191-199.
31. **Trinh, S., Haggoud, A., Reyset, G, and Sebald, M** (1995) Plasmids plP419 and plP421 from *Bacteroides*: 5-nitroimidazole resistance genes and their upstream insertion sequence elements. *Microbiology*, 141: 927-935
32. **Li, L. Y. Shoemaker N. B. and Salyers A. A. (1995)** Location and characteristics of the transfer region of a *Bacteroides* conjugative transposon and regulation of transfer genes. *J. Bacteriol.* 177(17): 4992.
33. **Salyers, A. A., Shoemaker, N. B., Stevens, A. M., and Li, L. Y.** (1995). Conjugative transposons: an unusual and diverse set of integrated gene transfer elements. *Microbiol. Rev.* 59(4): 579-590.
34. **Parker, A. C. and Smith C. J.** (1993). Genetic and biochemical analysis of a novel ambler Class A β -Lactamase responsible for cefoxitin resistance in *Bacteroides* species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 37(5): 1028-1036.
35. **Smith, C. J., Macrina L. F.** (1984). Large transmissible clindamycin resistance plasmid in *Bacteroides ovatus* . *J. Bacteriol.* 158(2): 739-441.

36. **Heffron, F., McCarthy B. J., Ohtsubo, H., Ohtsubo, E.** (1979). DNA sequence analysis of the transposon Tn3: Three genes and three sites involved in transposition of Tn3. *Cell* **18**(4): 1153-1163.
37. **Cerdeno-Tárraga, A. M., et al.** (2005) Extensive DNA inversions in the *B. fragilis* genome control variable gene expression. *Science* **307**: 1463-1465.
38. **Kuwahara, T. et al.** (2004). Genomic analysis of *Bacteroides fragilis* reveals extensive DNA inversions regulating cell surface adaptation. *PNAS* **101**(41): 14919-14924.
39. **Kevei F., Kucsera J.,** (1997) Mikrobiológia I. JATE Press
40. **Callihan, D.R., Young, F.R., Clark, V.L.** (1983) Identification of three homology classes of small, cryptic plasmids in intestinal *Bacteroides* species. *Plasmid* **9**: 17–30.
41. **Smith, C. J., Rollins, L. A., Parker A. C.** (1995) Nucleotide Sequence determination and genetic analysis of the *Bacteroides* plasmid, pBI143. *Plasmid* **34**: 211–222.
42. **Pedraza, R. O., Díaz Ricci, J. C.** (2002) In-well cell lysis technique reveals two new megaplasmids of 103.0 and 212.6 MDa in the multiple plasmid-containing strain V517 of *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology* **34**: 130-133
43. **Macrina, M. F., Kopecko, D. J., Jones K. R., Ayers, D. J., McCowen, S. M.** (1978) A multiple plasmid-containing *Escherichia coli* strain: convenient source of size reference plasmids molecules. *Plasmid* **1**: 417-420.
44. **Threlfall, E. J., Rowe, B., Ferguson, J. L., Ward, L. R.** (1986) Characterization of plasmids conferring resistance of gentamicin and apramycin in strains of *Salmonella typhimurium* phage type 204c isolated in Britain. *J. Hyg.* **97**: 419-26
45. **Rothberg, J. M., Hinz, W., Rearick, T. M. et al** (2011) An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature* **475**: 348-352.
46. **Novicki, T. J., Hecht, D. W.** (1995) Characterization and DNA sequence of the mobilization region of pLV22a from *Bacteroides fragilis*. *J. Bacteriology* **177**(15): 4466–4473.

VIII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet szeretném kifejezni:

Témavezetőmnek, Dr. Sóki Józsefnek a sok elméleti útmutatásáért és az idejét nem kímélő segítségéért, melyek nélkül munkámat nem tudtam volna elvégezni,

Prof. Dr. Deák Juditnak és Prof. Dr. Nagy Erzsébetnek, hogy lehetővé tették számomra a munkát a Szegedi Tudományegyetem Klinikai Mikrobiológiai Diagnosztikai Intézetében,

valamint, a Szegedi Tudományegyetem Klinikai Mikrobiológiai Diagnosztikai Intézetében dolgozó minden munkatársnak, akik bármilyen formában hozzásegítettek munkám sikeres elvégzéséhez.

IX. FÜGGELÉK

F1. Táblázat. A *B. fragilis* 13422 plazmidjai szekvenálásának fő kontigjai

Query	Lowest E-value	Greatest hit length	Greatest bit score	Description (bit score)
13422 lonXpress_002_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-17_Auto_1PG-17_16 trimmed contig 16	0	3853	7043,8	Bacteroides fragilis YCH46 DNA, complete genome
13422 lonXpress_002_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-17_Auto_1PG-17_16 trimmed contig 19	0	3073	4609,47	Bacteroides fragilis YCH46 DNA, complete genome
13422 lonXpress_002_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-17_Auto_1PG-17_16 trimmed contig 2	0	1968	3671,81	Bacteroides fragilis 638R genome
13422 lonXpress_002_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-17_Auto_1PG-17_16 trimmed contig 87	0	1828	2274,25	Bacteroides fragilis YCH46 DNA, complete genome
13422 lonXpress_002_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-17_Auto_1PG-17_16 trimmed contig 91	0	1726	3114,77	Bacteroides fragilis YCH46 DNA, complete genome
13422 lonXpress_002_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-17_Auto_1PG-17_16 trimmed contig 3	0	1635	3112,79	Bacteroides salanitronis DSM 18170 plasmid pBACSA03, complete sequence
13422 lonXpress_002_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-17_Auto_1PG-17_16 trimmed contig 14	0	1634	2803,54	Bacillus amyloliquefaciens LL3 plasmid pMC1, complete sequence
13422 lonXpress_002_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-17_Auto_1PG-17_16 trimmed contig 47	0	1394	2321,83	Bacteroides fragilis 638R genome
13422 lonXpress_002_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-17_Auto_1PG-17_16 trimmed contig 32	0	1383	2585,48	Bacteroides fragilis 638R genome
13422 lonXpress_002_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-17_Auto_1PG-17_16 trimmed contig 29	0	1375	2409,05	Bacteroides salanitronis DSM 18170 plasmid pBACSA03, complete sequence
13422 lonXpress_002_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-17_Auto_1PG-17_16 trimmed contig 10	0	1342	2644,95	Bacteroides fragilis mobilization protein MbpA (mbpA), MbpB (mbpB) and MbpC (mbpC) genes, complete cds
13422 lonXpress_002_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-17_Auto_1PG-17_16 trimmed contig 104	0	1136	1911,48	Bacteroides fragilis 638R genome
13422 lonXpress_002_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-17_Auto_1PG-17_16 trimmed contig 184	0	976	1612,15	Bacteroides fragilis 638R genome
13422 lonXpress_002_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-17_Auto_1PG-17_16 trimmed contig 186	0	962	1247,39	Bacillus licheniformis, plasmid pFL11 partial rep11 gene
13422 lonXpress_002_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-17_Auto_1PG-17_16 trimmed contig 93	0	947	1764,79	Bacteroides fragilis YCH46 DNA, complete genome
13422 lonXpress_002_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-17_Auto_1PG-17_16 trimmed contig 124	0	822	1390,12	Bacteroides fragilis YCH46 DNA, complete genome
13422 lonXpress_002_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-17_Auto_1PG-17_16 trimmed contig 141	0	785	1485,28	Bacillus licheniformis plasmid pFL5, complete plasmid sequence
13422 lonXpress_002_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-17_Auto_1PG-17_16 trimmed contig 27	0	763	1346,51	Bacteroides fragilis 638R genome
13422 lonXpress_002_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-17_Auto_1PG-17_16 trimmed contig 23	0	757	1413,91	Bacteroides fragilis 638R genome
13422 lonXpress_002_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-17_Auto_1PG-17_16 trimmed contig 409	7,12181E-036	746	161,064	Bacteroides vulgatus ATCC 8482, complete genome
13422 lonXpress_002_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-17_Auto_1PG-17_16 trimmed contig 13	0	721	1227,57	Bacteroides fragilis YCH46 DNA, complete genome

13422 lonXpress_002_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-17_Auto_1PG-17_16 trimmed contig 101	0	695	1378,23	Bacterium NLAE-zl-P871 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
13422 lonXpress_002_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-17_Auto_1PG-17_16 trimmed contig 146	0	668	1033,3	Bacteroides fragilis conjugative transposon CTn341, complete sequence
13422 lonXpress_002_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-17_Auto_1PG-17_16 trimmed contig 445	1,14484E-089	631	339,475	Bacteroides vulgatus ATCC 8482, complete genome
13422 lonXpress_002_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-17_Auto_1PG-17_16 trimmed contig 105	0	607	997,617	Bacteroides fragilis NCTC 9343 pBF9343 plasmid complete sequence
13422 lonXpress_002_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-17_Auto_1PG-17_16 trimmed contig 38	0	568	1102,68	Uncultured bacterium clone LM0ACA14ZD04FM1 genomic sequence
13422 lonXpress_002_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-17_Auto_1PG-17_16 trimmed contig 628	0	522	789,47	Bacteroides thetaiotaomicron conjugative transposon CTnDOT, transfer region
13422 lonXpress_002_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-17_Auto_1PG-17_16 trimmed contig 242	1,49727E-041	514	178,905	Bacteroides vulgatus ATCC 8482, complete genome
13422 lonXpress_002_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-17_Auto_1PG-17_16 trimmed contig 30	0	508	886,605	Bacillus licheniformis plasmid pFL5, complete plasmid sequence
13422 lonXpress_002_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-17_Auto_1PG-17_16 trimmed contig 199	0	503	690,352	Bacteroides fragilis transposon NBU2 lincomycin resistance gene (linAn2), MefEn2 (mefEn2), integrase (intN2), PrmN2 (prmN2), and mobilization protein (mobN2) genes, complete cds; and unknown genes
13422 lonXpress_002_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-17_Auto_1PG-17_16 trimmed contig 408	0	502	866,782	Bacteroides fragilis 638R genome
13422 lonXpress_002_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-17_Auto_1PG-17_16 trimmed contig 44	1,37071E-046	501	200,711	Bacteroides vulgatus ATCC 8482, complete genome
13422 lonXpress_002_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-17_Auto_1PG-17_16 trimmed contig 867	2,76488E-160	496	573,393	Bacteroides fragilis NCTC 9343, complete genome
13422 lonXpress_002_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-17_Auto_1PG-17_16 trimmed contig 854	0	494	704,229	Bacteroides fragilis 638R genome

F2. Táblázat. A *B. fragilis* 76240 plazmidjai szekvenálásának fő kontigjai

Query	Lowest E-value	Greatest hit length	Greatest bit score	Description (bit score)
76240 lonXpress_003_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-17_Auto_1PG-17_16 trimmed un-mapped reads contig 132	0	2623	4597,57	Bacteroides fragilis transposon Tn4555 TnpA (tnpA), integrase (int), TnpC (tnpC), excisionase (xis), mobilization protein (mobA), and beta-lactamase (cfxA) genes, complete cds; and unknown genes
76240 lonXpress_003_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-17_Auto_1PG-17_16 trimmed un-mapped reads contig 5	0	1603	3138,56	Bacteroides fragilis strain P35 plasmid pBFP35, complete sequence
76240 lonXpress_003_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-17_Auto_1PG-17_16 trimmed un-mapped reads contig 93	0	1599	3055,3	Bacteroides fragilis strain GBR8 carbapenem-resistance protein (cfiA) gene, partial cds; and insertion sequence IS614B Tp614 gene, complete cds
76240 lonXpress_003_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-17_Auto_1PG-17_16 trimmed un-mapped reads contig 88	0	1569	2343,64	Bacteroides thetaiotaomicron VPI-5482, complete genome
76240 lonXpress_003_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-17_Auto_1PG-17_16 trimmed un-mapped reads contig 92	0	1298	2196,94	Bacteroides fragilis transposon Tn4555 TnpA (tnpA), integrase (int), TnpC (tnpC), excisionase (xis), mobilization protein (mobA), and beta-lactamase (cfxA) genes, complete cds; and unknown genes
76240 lonXpress_003_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-17_Auto_1PG-17_16 trimmed un-mapped reads contig	0	1113	1400,03	Bacteroides thetaiotaomicron VPI-5482, complete genome

219			
76240			
lonXpress_003_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-17_Auto_1PG-17_16 trimmed un-mapped reads contig 101	0	1070	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> VPI-5482, 1681,53 complete genome
76240			
lonXpress_003_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-17_Auto_1PG-17_16 trimmed un-mapped reads contig 33	0	1059	<i>Bacteroides fragilis</i> strain P35 plasmid pBFP35, 1875,8 complete sequence
76240			
lonXpress_003_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-17_Auto_1PG-17_16 trimmed un-mapped reads contig 22	0	1054	<i>Bacteroides fragilis</i> strain P35 plasmid pBFP35, 2018,53 complete sequence
76240			
lonXpress_003_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-17_Auto_1PG-17_16 trimmed un-mapped reads contig 462	0	893	<i>Bacteroides fragilis</i> YCH46 DNA, complete 1485,28 genome
76240			
lonXpress_003_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-17_Auto_1PG-17_16 trimmed un-mapped reads contig 184	0	825	<i>Bacteroides fragilis</i> transposon Tn4555 TnpA (tnpA), integrase (int), TnpC (tnpC), excisionase (xis), mobilization protein (mobA), and beta-lactamase (cfxA) genes, complete cds; and 1560,61 unknown genes
76240			
lonXpress_003_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-17_Auto_1PG-17_16 trimmed un-mapped reads contig 284	0	802	<i>Bacteroides fragilis</i> transposon Tn4555 TnpA (tnpA), integrase (int), TnpC (tnpC), excisionase (xis), mobilization protein (mobA), and beta-lactamase (cfxA) genes, complete cds; and 1542,76 unknown genes
76240			
lonXpress_003_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-17_Auto_1PG-17_16 trimmed un-mapped reads contig 288	0	793	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> VPI-5482, 961,935 complete genome
76240			
lonXpress_003_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-17_Auto_1PG-17_16 trimmed un-mapped reads contig 137	0	783	<i>Bacteroides fragilis</i> YCH46 DNA, complete 1263,25 genome
76240			
lonXpress_003_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-17_Auto_1PG-17_16 trimmed un-mapped reads contig 90	0	746	890,57 <i>Alistipes shahii</i> WAL 8301 draft genome
76240			
lonXpress_003_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-17_Auto_1PG-17_16 trimmed un-mapped reads contig 208	0	730	<i>Bacteroides fragilis</i> YCH46 DNA, complete 1300,92 genome
76240			
lonXpress_003_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-17_Auto_1PG-17_16 trimmed un-mapped reads contig 370	0	714	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> VPI-5482, 1061,05 complete genome
76240			
lonXpress_003_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-17_Auto_1PG-17_16 trimmed un-mapped reads contig 345	0	712	<i>Bacteroides fragilis</i> YCH46 DNA, complete 1074,93 genome
76240			
lonXpress_003_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-17_Auto_1PG-17_16 trimmed un-mapped reads contig 120	0	705	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> VPI-5482, 1312,81 complete genome
76240			
lonXpress_003_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-17_Auto_1PG-17_16 trimmed un-mapped reads contig 197	0	684	<i>Bacteroides fragilis</i> YCH46 DNA, complete 957,97 genome
76240			
lonXpress_003_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-17_Auto_1PG-17_16 trimmed un-mapped reads contig 34	0	667	Uncultured organism clone 1041059766187 1249,38 genomic sequence
76240			
lonXpress_003_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-17_Auto_1PG-17_16 trimmed un-mapped reads contig 357	0	665	<i>Bacteroides fragilis</i> YCH46 DNA, complete 1013,48 genome
76240			
lonXpress_003_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-17_Auto_1PG-17_16 trimmed un-mapped reads contig 353	0	658	<i>Bacteroides fragilis</i> YCH46 DNA, complete 1191,89 genome
76240			
lonXpress_003_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-17_Auto_1PG-17_16 trimmed un-mapped reads contig 382	0	646	<i>Bacteroides vulgatus</i> ATCC 8482, complete 819,205 genome
76240			
lonXpress_003_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-	0	642	Cloning vector pFD288 beta-galactosidase 1178,01 (lacZ') gene, partial cds, spectinomycin

17_Auto_1PG-17_16 trimmed un-mapped reads contig 16				adenyltransferase (aad9), rRNA methyltransferase (ermF), replication protein (repA) and (mobA) genes, complete cds
76240 lonXpress_003_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-17_Auto_1PG-17_16 trimmed un-mapped reads contig 449	0	625	991,67	Bacteroides fragilis YCH46 DNA, complete genome
76240 lonXpress_003_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-17_Auto_1PG-17_16 trimmed un-mapped reads contig 423	0	622	1007,53	Bacteroides fragilis YCH46 DNA, complete genome
76240 lonXpress_003_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-17_Auto_1PG-17_16 trimmed un-mapped reads contig 18	0	600	1067	Uncultured organism clone 1041059766597 genomic sequence
76240 lonXpress_003_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-17_Auto_1PG-17_16 trimmed un-mapped reads contig 239	0	588	1063,03	Bacteroides vulgatus ATCC 8482, complete genome
76240 lonXpress_003_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-17_Auto_1PG-17_16 trimmed un-mapped reads contig 315	0	578	1114,58	Bacteroides fragilis transposon Tn4555 TnpA (tnpA), integrase (int), TnpC (tnpC), excisionase (xis), mobilization protein (mobA), and beta-lactamase (cfxA) genes, complete cds; and unknown genes
76240 lonXpress_003_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-17_Auto_1PG-17_16 trimmed un-mapped reads contig 251	0	571	1031,32	Bacteroides vulgatus ATCC 8482, complete genome
76240 lonXpress_003_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-17_Auto_1PG-17_16 trimmed un-mapped reads contig 461	0	569	870,746	Uncultured organism clone VC1A623TF genomic sequence
76240 lonXpress_003_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-17_Auto_1PG-17_16 trimmed un-mapped reads contig 211	0	567	749,823	Uncultured organism clone 1041059765804 genomic sequence
76240 lonXpress_003_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-17_Auto_1PG-17_16 trimmed un-mapped reads contig 216	0	564	957,97	Bacteroides fragilis YCH46 DNA, complete genome
76240 lonXpress_003_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-17_Auto_1PG-17_16 trimmed un-mapped reads contig 394	0	554	805,329	Bacteroides thetaiotaomicron VPI-5482, complete genome
76240 lonXpress_003_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-17_Auto_1PG-17_16 trimmed un-mapped reads contig 415	0	553	1015,46	Bacteroides fragilis transposon Tn4555 TnpA (tnpA), integrase (int), TnpC (tnpC), excisionase (xis), mobilization protein (mobA), and beta-lactamase (cfxA) genes, complete cds; and unknown genes
76240 lonXpress_003_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-17_Auto_1PG-17_16 trimmed un-mapped reads contig 322	0	547	954,005	Bacteroides fragilis YCH46 DNA, complete genome
76240 lonXpress_003_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-17_Auto_1PG-17_16 trimmed un-mapped reads contig 432	0	545	906,429	Bacteroides fragilis YCH46 DNA, complete genome
76240 lonXpress_003_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-17_Auto_1PG-17_16 trimmed un-mapped reads contig 237	0	543	922,288	Uncultured organism clone 1041059767601 genomic sequence
76240 lonXpress_003_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-17_Auto_1PG-17_16 trimmed un-mapped reads contig 420	0	541	967,882	Uncultured organism clone 1041059764524 genomic sequence
76240 lonXpress_003_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-17_Auto_1PG-17_16 trimmed un-mapped reads contig 186	0	539	979,776	Bacteroides fragilis YCH46 DNA, complete genome
76240 lonXpress_003_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-17_Auto_1PG-17_16 trimmed un-mapped reads contig 274	0	524	785,505	Bacteroides fragilis YCH46 DNA, complete genome
76240 lonXpress_003_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-17_Auto_1PG-17_16 trimmed un-mapped reads contig 464	0	522	771,629	Uncultured organism clone 1041059766557 genomic sequence

76240				
lonXpress_003_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-17_Auto_1PG-17_16 trimmed un-mapped reads contig 223	0	521	837,046	Bacteroides fragilis YCH46 DNA, complete genome
76240				
lonXpress_003_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-17_Auto_1PG-17_16 trimmed un-mapped reads contig 354	0	519	783,523	Bacteroides thetaiotaomicron VPI-5482, complete genome
76240				
lonXpress_003_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-17_Auto_1PG-17_16 trimmed un-mapped reads contig 496	0	516	837,046	Uncultured organism clone 1041059767601 genomic sequence
76240				
lonXpress_003_R_2012_04_16_13_33_40_user_1PG-17_Auto_1PG-17_16 trimmed un-mapped reads contig 451	0	504	858,852	Bacteroides fragilis transposon Tn4555 TnpA (tnpA), integrase (int), TnpC (tnpC), excisionase (xis), mobilization protein (mobA), and beta-lactamase (cfxA) genes, complete cds; and unknown genes

X. NYILATKOZAT A PÁLYÁZÓ EGYÉNI HOZZÁJÁRULÁSÁRÓL A PÁLYAMŰBEN LEÍRT EREDMÉNYEKHEZ

Alulírott, Fenyvesi Viktor Sándor biológus szakos hallgató a fenti dolgozatban foglaltakhoz

1, Plazmidok izolálásával,

2, Gél elektroforézissel történő analízisével,

3. Southernblot elvégzésével és fragmentumok méretének meghatározásával
járult hozzá.

Fenyvesi Viktor Sándor
2012. április 16

