

Elméleti orvostudományok - Kísérletes immunológia, mikrobiológia 2.

Új határok a bakteriális genomszerkesztésben – rekombináció alapuló genommérnökség hatásfokának növelése és gazda specifikitásának kiszélesítése

CZIKELY MÁRTON
Általános Orvos, Osztatlan, 7. félév

Szegedi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar

Bevezetés: A rekombinációs genommérnökség lehetővé teszi új funkcióval bíró fehérjék előállítását, evolúciós folyamatok vizsgálatát vagy egyéb genotípus-fenotípus asszociációs vizsgálatokat. A módszer eddig kiaknázatlan maradt, mert a rekombinációs genommérnökség főleg *Escherichia coli*-ban mutatott kielégítő hatásfokot. Az ún. egyszerű DNS kapcsoló proteinek (ssDNA annealing proteins -SSAP) kulcsszerepet játszanak a rekombinációs genom szerkesztés folyamatában, mivel ezen enzimek illesztik a kívánt szekvenciát a komplementer szálhoz a replikációs villában.

Céltűzés: Célunk az volt, hogy új SSAP-k felkutatásával és alkalmazásával növeljük a rekombinációs genommérnökség hatásfokát és kibővítsük a bakteriális fajok listáját, amiben alkalmazható a technika.

Módszerek: Első lépésként egy általunk fejlesztett szűrési módszerrel új SSAP jelölteket kerestünk. Ezt követően az ígéretes hatásfokot mutató jelölteket beillesztettük az általunk kidolgozott pORTMAGE plazmid rendszerbe (Nyerges és mtsai. PNAS-2016), hogy vizsgálhassuk az mutációk irányított bevitelének hatásfokát számos egymástól csak távoli rokonságban lévő bakteriális fajban.

Eredmények: Két új ígéretes jelöltet azonosítottunk. Az egyik SSAP 10-szeresére növelte a többszörös mutációbevitel hatékonyságát. A másik enzim lehetővé tette a hatékony mutációbevitelt egy bakteriális korokozóban (*Pseudomonas aeruginosa*). Ez a baktérium gyakori oka az életet veszélyeztető kórházi fertőzéseknek. (T. M. Wannier, M. Czikkely és mtsai. PNAS-2020)

Következtetések: Az új szűrési módszer lehetővé teszi, hogy új, nagy hatásfokkal működő SSAP-ket azonosítsunk. Ezáltal új fajokban, nagyobb hatásfokkal alkalmazhatjuk a rekombináció alapuló genommérnökséget. Munkánk nagy módszertani előrelépés, és számos tudományág -evolúció biológia, a biotechnológia és az antibiotikumrezisztencia kutatás -számára is fontos lehet.

Támogatók: ÚNKP-19-2 ÚJ NEMZETI KIVÁLÓSÁG PROGRAM (ITM), SZEGEDI ORVOSBIOLÓGIAI KUTATÁSOK JÖVŐÉRT ALAPITVÁNY (EMMI -TSZ. 11136-2/2019/FIRFIN), STEPHEN W. KUFFLER KUTATÁSI ALAPITVÁNY

Témavezető: Dr. Pál Csaba, tudományos főmunkatárs, Eötvös Loránd Kutatási Hálózat - Szegedi Biológiai Kutató Központ - Biokémia Intézet - Szintetikus és Rendszer Biológiai Egység

A mikrobiom összetételének és diverzitásának analízise karbapenémáz-termelő *Klebsiella pneumoniae*vel kolonizált egerekben

FARKAS FERENC BALÁZS
Általános orvos, Osztatlan, 10. félév

Semmelweis Egyetem
Általános Orvostudományi Kar

A multirezisztens baktériumok megjelenése és terjedése világszerte komoly veszélyforrást jelent. A széles spektrumú β -laktamáz (ESBL) és a karbapenémáz termelő Enterobacteriaceae (CPE) a WHO antimikrobiális rezisztencia listáján a kritikus kategóriában szerepelnek. Ezek a baktériumok a kórházi infekciók nagy hányadért felelősek. A CPE-k elleni terápiás lehetőségek korlátozottak, ezért ezen baktériumok terjedésének kontrollálása kiemelkedő fontosságú. Az emésztőrendszeri kolonizáció döntő szerepet játszik a CPE-k disszeminációjában.

Jelen kutatásban célunk a mikrobiom összetételének és diverzitásának vizsgálata volt *Klebsiella pneumoniae* (KP5825) törzzsel kolonizált egerekben, melyek különböző per os antibiotikum kezelést kaptak. Ez a törzs egy PMQR gént, egy ESBL gént és egy karbapenémáz gént expresszált. Célunk továbbá a KP5825 kolonizációs rátájának, valamint a rezisztencia gén kópiaszámok (RGCN) változásának vizsgálata volt.

Kísérleti állatmodellünkben hím, 6-8 hetes, C57BL/6 egereket alkalmaztunk. A kolonizációhoz 5×10^6 CFU KP5825 szuszpenziót juttatunk be orálisan, ampicillin (AMP) előkezelés 14., valamint 15. napján. Ezt követően az állatokat 6 csoportba osztottuk. A csoportok a következő antibiotikus kezelést kapták 15 napon keresztül az ivóvízbe keverve: 0.5g/L AMP, 0.1g/L ceftazidim (CAZ), 0.5g/L CAZ, 0.1g/L ciprofloxacim (CIP) és 0.5g/L CIP (6. csoport: kontroll). Minden 3. napon friss székletmintákat gyűjtöttünk, melyekből mikrobiális DNS izolálása történt.

Kísérleteink második szakaszában a KP5825 DNS mennyiségének, valamint a RGCN meghatározásához qPCR technikát alkalmaztunk. Az intestinális mikrobióta összetételének és diverzitásának meghatározásához a 16S rRNS gén V3-V4 régiója amplifikálásra, majd szekvenálásra került Illumina MiSeq platformmal.

Eredményeink alapján megállapítható, hogy az AMP és a CAZ kezelés növelte a KP5825 kolonizációját és csökkentette a bél mikrobióta diverzitását. Ezzel szemben a CIP kezelés nem változtatta a kolonizációs rátát. Továbbá erős negatív korrelációt figyelhetünk meg a Lachnospiraceae NK4A136 group 11319, Roseburia, Anaerostipes, Lachnospiraceae 11308, Lachnospiraceae UCG-004, Tyzzerella, Agathobacter, Lachnospiraceae NK3A20 group 11318 genusok és a KP5825 kolonizációs rátái között.

Témavezető: Dr. Szabó Dóra, egyetemi tanár, SE ÁOK



I. Díjban részesültek



Tagozat	Témavezetők	Támogató	
Kolarovszki-Erdei Diána SZAOK V. évf.	Konzervatív klinikai orvostudomány 1.	Dr. Farkas Klaudia <i>egyetemi docens</i> Dr. Molnár Tamás <i>egyetemi tanár</i> SZTE SZAOK, Belgyógyászati Klinika	SZAOK TDK Tanács Fiatal Gastroenterológusok Munkacsoportja <i>Kongresszusi részvétel</i>
Perényi Domonkos SZAOK III. évf. Donka Tibor SZAOK IV. évf.	Operatív orvostudomány 2.	Dr. Hartmann Petra <i>egyetemi adjunktus</i> Dr. Horváth Tamara <i>tudományos segédmunkatárs</i> SZTE SZAOK, Traumatológiai Klinika SZTE SZAOK, Sebészeti Műtéttani Intézet	Szegedi Orvosbiológiai Kutatások Jövőéért Alapítvány
Czikkely Márton Simon SZAOK V. évf.	Sejtbiológia, mikrobiológia, molekuláris biológia 1.	Dr. Pál Csaba <i>tudományos tanácsadó</i> SZBK Biokémia Intézet, Szintetikus és Rendszerbiológiai Egység	Szegedi Orvosbiológiai Kutatások Jövőéért Alapítvány Richter Gedeon NyRt.

