

Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

Szarvasmarha eredetű atípusos *Escherichia coli* O157
törzsek virulenciafaktorainak genetikai háttere

PhD értekezés

Sváb Domonkos László

2013

Témavezető és témabizottsági tagok:

.....

Dr. Tóth István, az MTA doktora
MTA ATK Állatorvos-tudományi Intézete
témavezető

.....

Prof. Dr. Nagy Béla, az MTA rendes tagja
MTA ATK Állatorvos-tudományi Intézete
témabizottság tagja

Készült 8 példányban. Ez a n. sz. példány.

.....

Sváb Domonkos László

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	3
Gyakori rövidítések jegyzéke	6
Összefoglalás	7
Általános bevezető	9
1. Irodalmi áttekintés	10
1.1. A patogén <i>Escherichia coli</i> -ről röviden általában	10
1.1.1. Patotípusok	10
1.1.2. Virulenciafaktorok	11
1.1.3. Mobilis genetikai elemek	12
1.1.4. A patogén <i>E. coli</i> törzsek filogenetikája	14
1.2. Enterohemorragiás <i>Escherichia coli</i>	15
1.3. Long polar fimbria	18
1.3.1. Felfedezés és nevezéktan	18
1.3.2. Az Lpf elterjedtsége	20
1.3.4. Az Lpf szerepe az adhézióban	21
1.4. Citoletális duzzasztó toxinok	22
1.4.1. Felfedezés és nevezéktan	22
1.4.2. Az CDT elterjedtsége <i>E. coli</i> törzsekben	24
1.4.3. A CDT hatásmechanizmusa	25
1.4.4. A CDT lehetséges szerepe a patogenezisben	27
1.4.5. Az EcolCDT genetikája	29
1.5. Célkitűzések	31
2. Az <i>lpf</i> operon tipizálása EHEC, EPEC és atípusos <i>E. coli</i> törzsek, valamint az ECOR törzsgyűjtemény tagjainak körében	32
2.1. Bevezetés	32
2.2. Anyagok és módszerek	32
2.2.1. Baktériumtörzsek	32
2.2.2. Fenotípusos vizsgálatok	32
2.2.3. Genotipizálás	33
2.2.3.1. DNS-izolálás	33
2.2.3.2. PCR reakciók	33
2.3. Eredmények	38
2.3.1. A vizsgálatban szereplő törzsek fő patogenetikai jellemzői	38
2.3.2. Az <i>lpf</i> genotipizálás eredményei	43

2.4. Megbeszélés	45
3. Az <i>lpf2</i> lókuszt klónoztása és szekvenálása	47
3.1. Bevezetés.....	47
3.2. Anyagok és módszerek	47
3.2.1. Baktériumtörzsek.....	47
3.2.2. Kozmid klónkönyvtár készítése.....	47
3.2.3. Reverz transzkripcióst PCR az <i>lpfA</i> génre	48
3.2.4. Szekvencia-meghatározás	51
3.2.5. Adhézión vizsgálatok	51
3.2.6. Lpf határoló régiók monitorozása.....	51
3.3. Eredmények	52
3.3.1. Az <i>lpf2-1</i> nukleotid szekvenciájának jellegzetességei az atípusos <i>E. coli</i> O157 törzsek körében.....	52
3.3.2. Az <i>lpf2-1</i> határoló régióinak jelenléte a vizsgált atípusos <i>E. coli</i> O157 és ECOR törzsek körében.....	54
3.3.3. Az Lpf2 expressziója és adhézión vizsgálatok	54
3.4. Megbeszélés	54
4. A citoletális duzzasztó toxin V termelését kódoló operon (<i>cdt-V</i>) és határoló régióinak szekvencia-meghatározása, valamint monitorozása patogén és kommenzalista <i>E. coli</i> törzsekben.....	57
4.1. Bevezetés.....	57
4.2. Anyagok és módszerek	57
4.2.1. Szekvencia-meghatározás	57
4.2.2. P2-szerű profág régiók monitorozása	58
4.2.3. Fágindukciós kísérletek	58
4.2.4. DNS izolálás fág-részecskékből és PCR	59
4.3. Eredmények	62
4.3.1. A T22 törzs <i>cdt-V</i> operonjának és azt tartalmazó P2-szerű profág általános nukleinsav-szintű jellemzői	62
4.3.2. A T22 törzs <i>cdt-V</i> hordozó P2-szerű profágjának további sajátosságai.....	62
4.3.3. P2-szerű profág gének elterjedtsége patogén és kommenzalista <i>E. coli</i> törzsek körében	65
4.3.4. Fágindukciós kísérletek eredményei.....	65
4.4. Megbeszélés	66
4.4.1. A <i>cdt-V</i> operon a T22 törzsben.....	66
4.4.2. A <i>cdt-V</i> hordozó P2-szerű profág általános jellemzői.....	66
4.4.3. Idegen gének integrációs helyei a P2-szerű profágban	69

4.4.4. P2-szerű fág gének különböző patotípusú <i>cdt-V</i> pozitív törzsekben	70
4.4.5. P2-szerű gének CDT-V-öt nem termelő <i>E. coli</i> törzsekben	70
4.4.6. Végső következtetések.....	71
5. Az <i>Escherichia coli</i> T22 O157:H43 törzs draft genom szekvenciája.....	72
5.1 Bevezetés.....	72
5.2. Anyagok és módszerek	72
5.2.1. DNS-izolálás.....	72
5.2.2. Szekvencia-meghatározás	72
5.2.3. Szekvenciaadatok elemzése	73
5.3. Eredmények	74
5.3.1. Az <i>E. coli</i> T22 O157:H43 törzs genomjának mérete és jellemzői	74
5.3.2. Virulenciagének integrációs helyei.....	74
5.3.3. Filogenetikai jellemzők	74
5.4. Megbeszélés	75
6. Záró megbeszélés	78
7. Új tudományos eredmények	81
8. Irodalomjegyzék	82
9. A doktori kutatás eredményeinek közlései.....	98
9.1. Lektorált tudományos folyóiratokban megjelent közlemények.....	98
9.2. Könyvfejezet.....	98
9.3. Konferenciaközlemények.....	98
10. A doktori kutatás témájához közvetlenül nem kapcsolódó eredmények közlései	99
Köszönetnyilvánítás	100

Gyakori rövidítések jegyzéke

- APEC – avian pathogenic *E. coli*; madár patogén *E. coli*
- CDT – citoletális duzzasztó toxin
- CHO – chinese hamster ovary cells; kínai aranyhórcsög petefészek sejtek
- EAEC – enteroaggregatív *E. coli*
- ECOR – *E. coli* Reference Collection; *E. coli* Referencia Törzsgyűjtemény
- EHEC – enterohemorrhagiás *E. coli*
- EPEC – enteropatogén *E. coli*
- ETEC – enterotoxikus *E. coli*
- ExPEC – extraintesztinális patogén *E. coli*
- HC – hemorrhagiás colitis; vérzéses vastagbélgyulladás
- HGT – horizontális géntranszfer
- HUS – hemolitikus urémiás szindróma
- LB – lysogeny broth tápleves
- Lpf – long polar fimbria
- MLST – multi-locus sequence typing; multi-lókus szekvencia tipizálás
- NGS – next generation sequencing; újgenerációs szekvencia-meghatározási módszer
- NMEC – newborn meningitis *E. coli*; újszülöttek agyhártyagyulladását okozó *E. coli*
- NTEC – nekrotoxikus *E. coli*
- PAI – pathogenicity island; patogenitási sziget
- REPEC – rabbit enteropathogenic *E. coli*; nyúl enteropatogén *E. coli*
- SNP – single nucleotide polymorphism; pontmutáció vagy egyetlen nukleotidot érintő nukleotid-csere
- STEC – Shiga-toxin termelő *E. coli*
- T3SS – type III secretion system; III-as típusú szekréciós rendszer
- TSB – tryptic soy broth; triptonos szója tápleves
- UPEC – uropatogén *E. coli*

Összefoglalás

„Szarvasmarha eredetű atípusos *Escherichia coli* O157 törzsek virulenciafaktorainak genetikai háttere” c. értekezésem előzményeként csoportunk egy korábbi munkája során *E. coli* O157 törzseket izolált egészséges szarvasmarhából, ami rezervoárja e jelentős humán patogéneknek. Számos enterohemorragiás (EHEC) és enteropatogén (EPEC) *E. coli* O157:H7 és O157:NM törzs mellett olyan *E. coli* O157 törzseket is izoláltak, melyek ritka szerotípusokat képviseltek és virulencia génkészletük is nagyban eltért a fent említett törzsekétől, ezért atípusosnak számítottak. Utóbbi törzsek többsége kizárólagos virulenciafaktorként termelte a citoletális duzzasztó toxin V-ös típusát (CDT-V), valamint a long polar fimbria (Lpf) nevű adhéziós faktort.

Az értekezésemben ismertetett vizsgálatok célja ezen korábban izolált atípusos *E. coli* O157 törzsek részletes genetikai jellemzése volt, különös tekintettel az említett két virulenciafaktorra.

Az Lpf esetében meghatároztuk annak pontos genetikai típusát mind az atípusos, mind részben egészséges szarvasmarhából, részben klinikai humán mintákból származó EHEC és EPEC (összesen 97 törzs), valamint az *E. coli* Reference Collection (ECOR) törzsek (n=72) esetében. Ennek során az atípusos törzsek által hordozott *lpf2-1* operonok egyértelműen elkülönültek az EHEC és EPEC O157 törzsek által hordozott, *lpf1-3* és *lpf2-2* típusú operonoktól, és megerősítést nyert, hogy a patogén *E. coli* törzsek körében igen elterjedt virulenciafaktorról van szó, mivel a 97 törzsből 95 hordozta legalább egy változatát. Klónoztuk és meghatároztuk *lpf2-1* operonnak és határoló régióinak nukleotid szekvenciáját egy O157:H43 szerotípusú atípusos törzsből, valamint az *lpf2-1* operonét további hat atípusos O157 törzsből. Az összesen hét atípusos törzs *lpf2-1* operonjai esetében mindössze négy pozícióban tapasztaltunk aminosav-szintű polimorfizmust. PCR reakciókkal monitoroztuk összesen kilenc jellegzetes, a határoló régióban található génszakasz jelenlétét 20 Lpf-pozitív törzsből, tizenöt közülük az összes vizsgált régiót hordozta. Adataink arra mutatnak, hogy az *lpf2-1* operon az atípusos O157 törzsek esetében egy konzervált genomi szigetet alkot, mely valószínűleg horizontális géntranszfer (HGT) révén terjedt el számos patogén *E. coli* törzs körében.

A CDT-V esetében szintén meghatároztuk kódoló operonjának (*cdt-V*) és az azt határoló régióknak a nukleotid szekvenciáját egy, a fenti vizsgálatokban is szereplő O157:H43

szerotípusú, atípusos *E. coli* törzsben. Úgy találtuk, hogy a *cdt-V* operont egy 31,2 kb hosszúságú, a kromoszómába épült P2-szerű profág hordozza. 20 jellegzetes genetikai régiójának jelenlétét a többi CDT-V termelő atípusos törzs, valamint egyéb szero- és patotípusokat képviselő tizennyolc törzs körében monitoroztuk PCR-reakciókkal. A CDT-V termelő atípusos O157 törzsek (n=4) pozitívak voltak a vizsgált szakaszok közül legalább tizennyolcra. A három, szintén CDT-V termelő EHEC O157:NM törzs 15-16 közti számú szakaszt hordozott, a CDT-V-öt nem termelő törzsek (n=11) pedig két kivétellel (15 és 12 hordozott szakasszal) legfeljebb két vizsgált szakaszra voltak pozitívak. Fágindukciós kísérleteink szerint a *cdt-V*-öt hordozó profágok egyik törzs esetében sem indukálhatók. Ebből arra következtethetünk, hogy a *cdt-V* operon egy P2-szerű bakteriofág közvetítésével terjedt el az atípusos és EHEC törzsek körében, és a fágok az egyes gazdák genomjába integrálódva alkalmazkodtak a gazdáikhoz, ennek eredményeképpen jöttek létre a szekvenciabeli eltérések, és veszítették el mobilitásukat.

Újgenerációs szekvencia-meghatározási módszerekkel (NGS) meghatároztuk az atípusos *E. coli* törzsek közül a T22 jelzésű, O157:H43 teljes genomjának szekvenciáját is draft genom szintig, elsőként ebből a szerotípusból. Megállapítottuk, hogy a törzs valóban új genotípust képvisel, és a különböző patotípusok virulenciafaktorainak integrációs helyei érintetlenek a genomjában, így a törzs valószínűleg köztes állomást jelenthet az O157 szerocsoport patogenetikai evolúciójában, és alkalmas lehet újabb virulenciagének felvételére.

Általános bevezető

Értekezésem alapjául az *E. coli* O157 szerocsoportú, változatos H antigénnel rendelkező törzsek genetikai vizsgálatát ismertető közleményeim szolgálnak. Ennek megfelelően az első fejezetben irodalmi áttekintést kívánok adni a patogén *Escherichia coli* törzsek genetikai jellegzetességeiről, különös tekintettel az O157 szerocsoport tagjai közt legjelentősebb patotípusra, az enterohemorragiás *Escherichia coli*-ra (EHEC); valamint a két általunk vizsgált virulenciafaktorról, a long polar fimbriáról (Lpf) és a citoletális duzzasztó toxinról (CDT).

Témavezetőmmel egyetértésben úgy döntöttünk, hogy az értekezés alapját képező közleményeinknek megfelelően a kísérletes munkák ismertetése értekezésemben négy részre bontva, azaz négy fejezetben történjen. Mindegyik fejezetben először a közvetlen előzményeket és célkitűzéseket ismertetem egy Bevezetésben, majd egy részletesebb Anyag és módszer, Eredmények és Megbeszélés alfejezet következik. Mivel az irodalmi áttekintésben kitérek az egyes vizsgált virulenciafaktorokkal kapcsolatos tudományos előzményekre, így azok részletes ismertetésétől a kísérletes fejezetekben már eltekintek. Értekezésemet pedig egy összefoglaló jellegű Záró megbeszélés fejezettel zárom.

Tekintettel arra, hogy a vizsgálatokkal kapcsolatos munkák döntő többségét, mint az értekezés alapját képező közlemények első szerzője, magam végeztem; viszont társszerzőimtől és a köszönetnyilvánításban felsorolt kollégáktól mind a kísérletes munka egyes fázisaiban, mind a kéziratok megírása során nélkülözhetetlen segítséget kaptam; ezért úgy érzem helyénvalónak, hogy az értekezést a tudományos közleményeknél szokásos módon többes szám első személyben fogalmazom meg.

Azon idegen eredetű szakkifejezések esetében, melyeknek létezik magyaros írásmódja, következetesen azt igyekeztem használni. Az értekezésben igen sok mozaikszó és rövidítés szerepel, és ugyan első előfordulásukkor az összesnek megadom a feloldását, ám a gyakoribbak esetében szükségesnek éreztem, hogy külön jegyzékben szerepeljenek.

1. Irodalmi áttekintés

1.1. A patogén *Escherichia coli*-ról röviden általában

Értekezésünk kulcsszereplő baktériumfaját, az *Escherichia coli*-t Theodor Escherich német gyermekorvos izolálta először egészséges kisgyermek székletéből a XIX. század végén, és mint a vastagbél normál mikrobiótájának részét képező organizmusnak, a *Bacterium coli commune* elnevezést adta neki. Később nevezték át a fajt a tiszteletére; és az emlősök vastagbél mikrobiótájának ezen fakultatív anaerob tagja felfedezésétől kezdve egészen napjainkig intenzív kutatás tárgyát képezi. Kulcsszerepe volt a molekuláris biológia fejlődésében, mint a génexpresszió szabályozásának legkorábbi modell-szervezete. Napjainkban is, mint a molekuláris klónozás leggyakoribb cél-organizmusa, a biológiai kutatások számos ágában kulcsszereplő, ezért a laboratóriumok „igáslovának” is nevezik (áttekinti Kaper 2005). Már a XX. század első felében felismerték azonban, hogy az *E. coli* egyes törzsei szerepet játszanak bélrendszeri és húgyúti megbetegedésekben, és az elmúlt évtizedekben a fajnak számtalan bélrendszeri és más megbetegedést okozó, mind humán, mind állati patogén törzsét izolálták és jellemezték. Jelen alfejezetben ezekről adunk rövid áttekintést.

1.1.1. Patotípusok

Az *E. coli* kommenzalista törzsei az emlősök bélcsatornájában honos mikrobióta egyik legnagyobb létszámban jelen lévő, Gram-negatív, fakultatív anaerob tagjai. Létezik azonban számos *E. coli* törzs, melyek specifikus virulenciafaktorokkal rendelkeznek, így humán és állati megbetegedések széles skáláját okozzák (Kaper et al., 2004). E virulenciafaktorok gyakran mobilis genetikai elemeken kódoltak (áttekinti Dobrindt 2005), melyeket az adott *E. coli* törzs képes más törzseknek is átadni horizontális géntranszfer (HGT) segítségével, ezáltal virulenciafaktorok új kombinációi jöhetnek létre. Más esetekben a mobilis genetikai elemek a genomba integrálódva elveszítik mobilitásukat. A különösen sikeres virulenciafaktor összetétellel bíró törzsek specifikus patotípusokba sorolhatók, e csoportokat specifikus virulenciafaktor összetétel és a törzsek által okozott jellegzetes kórkép definiálja. A különböző patotípusokba tartozó *E. coli* törzsek háromféle általános kórképet okozhatnak (Kaper et al., 2004):

- hasmenéssel vagy véres hasmenéssel járó enterális megbetegedés
- húgyúti fertőzés
- szepszis/szeptikémia, agyhártyagyulladás

Az enterális megbetegedéseket okozó patotípusokba tartozó törzseket összefoglaló néven intesztinális patogén *E. coli*-nak (intestinal pathogenic *E. coli*, ritkán használt rövidítéssel IntEC vagy IPEC) nevezzük, e törzsek közé az alábbi hat csoportot szokás sorolni (Kaper et al., 2004):

- enteropatogén *E. coli* (enteropathogenic *E. coli*, EPEC)
- enterohemorragiás *E. coli* (enterohaemorrhagic *E. coli*, EHEC)
- enterotoxikus *E. coli* (enterotoxigenic *E. coli*, ETEC)
- enteroaggregatív *E. coli* (enteroaggregative *E. coli*, EAEC)
- enteroinvazív *E. coli* (enteroinvasive *E. coli*, EIEC)
- diffúzan tapadó *E. coli* (diffusely adherent *E. coli*, DAEC)

Az extraintesztinális patogén *E. coli* (extraintestinal pathogenic *E. coli*, ExPEC) törzsek közé tartoznak a húgyúti fertőzésekért felelős uropatogén *E. coli* (uropathogenic *E. coli*, UPEC), az újszülöttek agyhártyagyulladását okozó *E. coli* (newborn meningitis *E. coli*, NMEC vagy MNEC) és a madarakban többféle extraintesztinális kórképet okozni képes madár patogén *E. coli* (avian pathogenic *E. coli*, APEC) törzsek.

A különböző patotípusokba tartozó *E. coli* törzsek általában klonális csoportokat alkotnak, melyeket az O antigén (a sejtfa részét képező lipopoliszacharid) alapján szerocsoportokba, az O és H antigének (utóbbi a flagelláris vagy csilló antigén) kombinációja alapján pedig szerotípusokba sorolunk. Az *E. coli* esetében a HGT gyakorisága folytán azonban egy adott törzset pusztán a szerotípusa alapján nem lehet patotípusba sorolni, ehhez feltétlenül szükséges virulenciafaktorainak jellemzése, és – amennyiben megbetegedésből származik – a tünetek és a kórkép ismerete. Erre szolgáltak drámai példával a 2011-es németországi járványt okozó O104:H4 szerotípusú törzsek. Noha e szerotípusba tartozó EHEC törzseket korábban már szórványosan izoláltak (áttekinti Karch et al., 2012), a 2011-es járványt okozó törzsek a Shiga-toxin termelését leszámítva genetikailag az EAEC törzsek jellegzetességeit mutatták; e törzsek feltehetőleg HGT segítségével tettek szert a toxint kódoló génre (Brzuszkiewicz et al., 2011).

1.1.2. Virulenciafaktorok

A patogén *E. coli* törzsek fertőzési folyamata több lépésből áll, az első a baktérium megtelepedése a gazda nyálkahártyájában, majd a gazda védekező mechanizmusainak elkerülése, végül pedig a kórokozó elszaporodása és a gazdaszervezet károsítása következik. A legtöbb patogén *E. coli* törzs extracelluláris kórokozó, kivéve az EIEC törzseket, melyek intracellulárisan fejtik ki hatásukat.

A fenti három lépés közül az első a megtelepedés, a kolonizáció. Azon faktorokat, melyek segítségével képesek a baktériumok kötődni a specifikus receptorokhoz, összefoglaló néven adhezineknek hívjuk. Ezek egyik jelentős csoportját alkotják a fimbriáknak, vagy pilusoknak nevezett struktúrák, és a fibrillákként említett képletek. A fimbriák általában 2-4 nm átmérőjű, pálcika-szerű képletek, a fibrillák ennél vékonyabb, hajlékony, ostorszerű struktúrák (Kaper et al., 2004). Adhezinek lehetnek még a külső membrán fehérjéi, mint például az EHEC, valamint az EPEC törzseknek az 1.2 fejezetben részletesebben is ismertetett intiminje, vagy az afimbriális adhezinek (AFA, Nowicki et al., 1990).

A gazdaszervezet károsítását, gyengítését a patogén *E. coli* törzsek sokszor különféle toxinok termelésével érik el. E toxinok változatos módokon, de jellegzetes hatásmechanizmussal befolyásolják az eukarióta sejtek élettani folyamatait. Az ETEC törzsek hőlabilis (heat-labile toxin, LT) és hőstabil (heat-stable toxin, ST) toxinjai a sejtmembrán ioncsatornáinak működését zavarják meg (Nagy és Fekete, 1999); az 1.2 fejezetben részletesebben is ismertetett Shiga-toxin az emlős sejtek fehérje-szintézisét gátolja; a ciklomodulinok, mint például a munkánk során genetikailag vizsgált és az 1.4 fejezetben tárgyalt citoletális duzzasztó toxin (CDT) pedig az emlős sejtek sejtciklusát állítja le.

A fentiekén kívül azok a sejtfelszíni struktúrák, melyek a kommenzalista *E. coli* törzsekben is jelen vannak, adott esetben szintén betölthetnek virulencia-faktor szerepet. A sejtfelszíni lipopoliszaharid, valamint a flagellin esetében is kimutatták, hogy a citokin-termelést képesek stimulálni a velük érintkezésbe kerülő sejteken, gyulladást, sőt szepszist is okozva (Tapping et al., 2000, Hayashi et al., 2001b).

1.1.3. Mobilis genetikai elemek

Az 1.1.1. alfejezetben említettük, hogy a patogén *E. coli* törzsek egyik jellegzetessége a virulenciafaktorokat kódoló gének mobilis genetikai elemeken való elhelyezkedése. Ennek megállapításához nagyban hozzájárult az elmúlt bő másfél évtizedben számos kommenzalista és patogén törzs teljes genomösszetételének meghatározása, és ezek összehasonlítása, mely „összehasonlító genomika” (angol nyelvű szakirodalomban „comparative genomics”) néven már önálló tudományterületté kezd válni. Az említett szekvencia-meghatározási projektek eredményei alapján általánosságban megállapítható, hogy az *E. coli* törzseknek létezik egy alapvető, genetikai „gerincnek” is tekinthető génkészlete, és a patogén törzsek genomja ezen felül tartalmazza a változatos virulenciafaktorokat (Dobrindt 2005).

A virulenciafaktorokat tartalmazó, mobilis genetikai elemek egyik nagy csoportját alkotják a patogenitási szigetek (pathogenicity island, PAI), ezek olyan nagyobb méretű (általában 10-200 kb hosszúságú) genomi régiók, melyek patogén törzsek genomjában jelen vannak, az apatogén törzsekéből azonban hiányoznak. A PAI-kra jellemző továbbá (Hacker és Kaper, 1999):

- GC arányuk jelentősen eltér a hordozó genom GC arányától
- rövid, ismétlődő „direct repeat” szekvenciák határolják őket, ezek a beépüléskor keletkezettek, és sokszor mutatnak hasonlóságot bakteriofágok génszakaszaival (Dobrindt et al., 2010).
- sokszor találhatóak a közelükben tRNS-t kódoló gének
- gyakran hordoznak olyan géneket vagy génmaradványokat, melyek a mobilitásukat elősegítő faktorokat (integrázok, transzpozázok) kódolnak

Az első részletesen jellemzett PAI-kat az 536 jelzésű UPEC törzs genomjából írták le, ezek közül például a PAI II₅₃₆ jelzésű sziget a P fimbriákat és hemolizint kódolja (Dobrindt et al., 2002). A PAI-k közül sok moduláris, mozaikos felépítésű; és így, bár sok olyan van, melyek a fő virulencia- vagy rezisztencia gének tekintetében hasonlóak egymáshoz, szerveződésükben és a kromoszómában elfoglalt helyük szempontjából nagy változatosságot mutatnak, még azonos szerotípusú törzseken belül is (Dobrindt, 2005).

A mobilis genetikai elemek egy másik csoportját alkotják a plazmidok, melyek sok patotípus esetében fontos szerepet töltenek be. Az ETEC esetében annak fő virulenciafaktorai, az ST és LT toxinok nagyméretű plazmidokon találhatóak (Echeverria et al., 1986), az EAEC törzsek többségében a fő virulenciafaktorok jelentős részét a pAA plazmid kódolja (áttekinti Okhuysen és DuPont, 2012). Az EHEC O157 szerocsoport törzseinek többsége hordozza a pO157 plazmidot, melyen megtalálható az enterohemolizint kódoló *ehx* gén, a kataláz-peroxidáz kódoló *katP*, a II-es típusú szekréción rendszer génje (*etp*), az *espP* szerin-proteáz gén, az *stcE* metalloproteáz kódoló gén, valamint két feltételezett adhezint kódoló gén, a *toxB* és az *ecf* is (Lim et al., 2010).

Virulencia géneken kívül a plazmidok gyakran hordoznak antibiotikum-rezisztencia géneket, valamint fém-kelátorokat és colicineket (az *E. coli* bakteriocinjei) kódoló géneket is (Dobrindt 2005). Evolúciós szempontból a plazmidok tekinthetők akár „epizomális genomi szigeteknek” is, mivel a plazmidokon kódolt géncsoportok közül sok előfordul a kromoszómában is, és adott esetben a plazmidok valóban beépülnek a kromoszómába (áttekinti Dobrindt 2005).

Mindezek alapján Dobrindt et al. (2010) azt a következtetést vonták le, hogy a patogén *E. coli* törzsek genomjai az evolúció során klonálisan fejlődő régiókból állnak, melyekbe helyenként HGT révén új elemek épülnek be. Egy meghatározott helyre akár több ilyen elem is halmozódhat az evolúció során, törzsspecifikus kombinációkat alakítva ki. Ezek a HGT

segítségével beépült elemek határoló régióik homológ rekombinációja segítségével terjedhetnek tovább a fajon belül (Dobrindt et al., 2010).

A kórokozó baktériumok körében gyakori jelenségnek mondható a virulenciafaktoroknak bakteriofágok által közvetített terjedése. A temperált, azaz litikusról lizogénre váltott, valamint a kriptikus, „rejtett”, már nem indukálható fágok tekinthetők akár a különböző genomi szigetnek, így a PAI-k őseinek is (Dobrindt et al., 2004). Több kórokozó esetében fontos virulenciafaktorok génjeiről igazolták, hogy bakteriofágok révén terjedt szét a törzsek közt, ilyen például a *Corynebacterium diphtheriae* által termelt diftériatoxin génje (*tox*), melyet a béta-fág hordoz, a patogén *E. coli* törzsek hemolizin-2 génjét (*hly2*) hordozó Φ FC3208 fág, valamint a *Salmonella enterica* III-as típusú effektorát hordozó fágok (Brüssow et al., 2004).

Nemcsak virulenciafaktorokat, hanem a hordozó törzs antigéntermelését módosító géneket is közvetíthetnek bakteriofágok, erre példa a *Shigella flexneri* O-antigén acetiláz génjét (*oae*) közvetítő Sf6 fág (Brüssow et al., 2004).

E. coli esetében a legtöbbet vizsgált konvertáló fágok az 1.2. fejezetben ismertetett EHEC törzsek fő virulenciafaktorát, a Shiga-toxint kódoló *stx1* és *stx2* géneket hordozó, Stx1 és Stx2 fágok (áttekinti Schmidt, 2001), melyek a lambdoid fágok közé tartoznak, ám az EHEC törzsek ezeken felül jellemzően jóval több, és különböző családokba sorolható fágot vagy profágot is hordoznak genomjukban. A következő fejezetben röviden ismertetett EHEC törzsei közül az O157:H7 szerotípusú Sakai törzs esetében, melynek teljes genom szekvenciája ismert, az Stx fágokat is beleértve tizenhét, a genomba épült bakteriofágról tudunk (Sp1-Sp18, Hayashi et al., 2001a, Asadulghani et al., 2009). Ezek különböző családokba tartozó fág-típusokat képviselnek: tizenegy lambdoid, egy P2-szerű, egy Mu-szerű, egy P4-szerű, négy pedig egyéb fág-típusba tartozik (Asadulghani et al., 2009). E profágok közül egyedül az Sp5, vagyis az Stx2 fág, és az Sp15, vagyis az Stx1 fág őrizték meg teljes mértékben funkciójukat, azaz képesek gazdájuk lízisére, és más (az idézett munkában K-12) törzsekbe történő transzdukcióra, azaz a törzsek konvertálására. Hét másik profág ugyan képes lízisre, de transzdukcióra nem, a többi profág pedig temperáltnak tekinthető (Asadulghani et al., 2009).

1.1.4. A patogén *E. coli* törzsek filogenetikája

Az *E. coli* törzsek evolúciójának megismeréséhez a horizontális géntranszfer folyamatok megismerése mellett kulcsfontosságú és régóta kutatott terület filogenetikai viszonyaik minél pontosabb feltárása. A patogén *E. coli* törzsek populációja alapvetően klonális felépítésű. A háztartási gének szekvenciáján alapuló multilókusz enzim elektroforézis (MLEE) és multilókusz szekvencia-tipizálás (MLST) módszerekkel végzett vizsgálatok eredményei

alapján négy (A, B1, B2, D), később öt (A, B1, B2, D, E) nagy filogenetikai csoportot különítettek el (áttekinti Johnson, 2002). E filogenetikai csoportok létezését később további nukleinsav-alapú vizsgálatok is megerősítették, mint a leginkább elterjedt és elfogadott, három háztartási gén nukleotid szekvenciáján alapuló triplex PCR rendszer is, melynek segítségével a négycsoportos felosztású rendszerbe a törzsek egyszerűen besorolhatók (Clermont et al., 2000). A kommenzalista törzsek jellemzően az A, az intesztinális patogén törzsek elsősorban az A és B1, az extraintesztinális kórokozók jellemzően a B2 és D csoportokban találhatóak, bár az egyes patotípusokat képviselő törzseket általában több filogenetikai csoportban is megtalálhatjuk (áttekinti Johnson, 2002 és Croxen et al., 2013).

1.2. Enterohemorragiás *Escherichia coli*

Mivel munkánk során legnagyobbbrészt az EHEC törzsek egyik legfontosabb szerocsoportjába tartozó, bár más patotípust képviselő törzsekkel foglalkoztunk, ezért szükséges röviden ismertetni az EHEC patotípust is. Az EHEC törzsek első képviselője egy 1982-es humán járvány okozója volt, mely rosszul átsütött marhahúsból származott (Riley et al., 1983). Az EHEC az esetek nagy részében véres hasmenést (hemorrhagiás colitis, vérzéssel járó vastagbélgyulladás, röviden HC), kisebb részében hemolitikus urémiás szindrómát (HUS) okoz. Az első járványok forrása többségében marhahús volt, és a szarvasmarha máig is az EHEC törzsek rezervoárjának tekinthető (Gyles, 2007). Az eltelt csaknem harminc év során más élelmiszerek széles skálájából (kolbász, friss zöldségek, spenót, almabor, pasztörizálatlan tej, Kaper et al., 2004), valamint ivóvízből is felbukkantak EHEC törzsek. Az 1996-ban Japánban, Sakai prefektúrában több mint 8000 megbetegedést okozó O157:H7 szerotípusú törzs takarmányrépából származott (Hayashi et al., 2001a), a 2011-ben Németországban járványt okozó O104:H4 szerotípusú törzsek egyike pedig étkezési célból csomagolt növényi csírákról (Weiser et al., 2013). Ezen kívül volt már példa élő állatokkal való kontaktus során bekövetkezett fertőződésre, és bár az EHEC törzsek elsősorban zoonotikusnak mondhatók, emberről emberre történő terjedésről is tudunk (Griffin és Tauxe, 1991). A sikeres EHEC fertőzéshez száznál kevesebb csíra is elegendő (Tilden et al., 1996). A legtöbb eddigi járványt O157:H7 szerotípusú törzsek okozták (Perna et al., 2001), ám a 2011-es németországi járvány kapcsán előtérbe került az O104:H4-es törzsek vizsgálata (Mellmann et al., 2011), valamint több járványt okoztak O111 (Campos et al., 1994) és O26 szerocsoportba tartozó törzsek is (Levine et al., 1987).

Az EHEC törzsek kulcs virulenciafaktorai a Shiga toxinok (eredetileg Shiga-like toxin, azaz „Shiga-szerű” toxin, röviden Stx) vagy más néven verotoxinok (röviden VT). Az első elnevezés arra utal, hogy a toxint termelő *E. coli* törzsek fehérje-kivonatával reagált a

Shigella dysenteriae 1-es toxinja ellen termelt ellenanyag (O'Brien et al., 1983), a második elnevezés pedig arra, hogy a toxin hatását először Vero-sejtkultúrán demonstrálták (Konowalchuk et al., 1977). E toxincsaládba két fő toxintípus tartozik, az Stx1 és Stx2, ezeket rendre az *stx1* és *stx2* operonok kódolják. Az Stx1 és Stx2 típusokon belüli további genetikai változatokat különböztetnek meg, az Stx1 esetében Stx1, Stx1c és Stx1d jelöléssel, az Stx2 esetében Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f és Stx2g változatokat különítenek el. Utóbbiak esetében a genetikai különbségen túl a hordozó törzsek patogenitásában is különbség van; míg ugyanis az Stx2c és Stx2d elsősorban humán megbetegedéseket okozó törzsekben fordul elő, addig az Stx2e a sertések ödéma betegségét okozó *E. coli* törzsek virulenciafaktora, az Stx2f-et galambokból izolált törzsekben azonosították, az Stx2g-t pedig egészséges szarvasmarhából származókban (áttekinti Slanec et al., 2009).

A toxin fehérje alegységei közül az aktív A alegységet a célsejtbe való bejutásban öt B (binding, azaz kötő) alegység segíti, utóbbi a globotriaoszil-ceramid vagy a globotetraoszil-ceramid (Gb3 és Gb4) nevű sejtfelszíni glikolipidekhez kötődik. Az A alegység RNáz aktivitással rendelkezik, és a riboszomális RNS-eket depurinálja, így leállítva a célsejt fehérjeszintézisét. A toxint a baktériumok a vastagbélben termelik, ahol az károsítja az endotheliumot, véres hasmenést, HC-t, végül nekrozist és akár perforációt is okozva. Az Stx az intesztinális nyálkahártyán átjutva a fehérvérsejtek felszínéhez asszociálisan a vérkeringéssel a vesékhez is eljut, ahol károsítja a hajszálereket, e folyamatok mechanizmusa részleteiben még nem tisztázott (áttekinti Caprioli et al., 2005). Mindezeknek következtében kialakulhat a HUS tünetegyüttes, melynek jellemzői a hemolitikus vérszegénység, a vérlemezkék számának csökkenése (thrombocytopaenia), valamint a hirtelen veseleállás.

Az EHEC törzsek másik kulcsfontosságú virulencia géncsoportja a LEE (Locus of Enterocyte Effacement) nevű PAI által kódolt gének összessége. Definíció szerint e gének által kódolt fehérjék az EPEC kulcs virulenciafaktorai. Amennyiben azonban az adott törzs a LEE hordozása mellett Stx-et is termel, akkor EHEC-nek kell tekinteni. A LEE virulenciagénjei közül a legjelentősebb az *eae*, ez az intimin nevű adhezint kódolja. Ez a nagyméretű, a külső membránban helyet foglaló fehérje (outer membrane protein, OMP) a baktériumnak az epithel-sejtekhez való szoros tapadását teszi lehetővé. E folyamatban fontos szerepe van még a szintén a LEE által kódolt III-as típusú szekréciós rendszernek (type III secretion system, T3SS), mely az ugyancsak a LEE-n kódolt Tir-t, vagyis a transzlokált intimin receptort viszi át a célsejt membránjába egyéb effektormolekulák mellett. A Tir, mint a neve is mutatja, receptorként szolgál az intimin számára. A baktériumok ilyen módon történő tapadása egy jellegzetes elváltozást, az A/E (attaching/effacing) léziót okozza, vagyis a bélhámsejtek mikrobolyhainak leépülését. Ennek látható jelei az epithel sejtekben, a membránjukhoz kívülről tapadt (attachment) baktériumok közelében a

polimerizált aktin felhalmozódása, a bélhám mikrobolyhainak leépülése (effacement) és az érintett epithel-sejtekben jellegzetes „emelvény” (az angol nyelvű irodalomban „pedestal”-nak nevezett) struktúrák megjelenése (áttekinti Kaper et al., 2004).

Ugyan 400-nál is több szerotípushoz tartozó *E. coli* törzsből mutattak már ki Stx-termelést, ám e törzsek többsége nem kapcsolódik betegségekhez, és LEE-t is csak kisebb részük hordoz (Kaper et al., 2004). Mivel EHEC-nek definíció szerint csak az Stx-et termelő és LEE-t is hordozó törzseket tekinthetjük, a csak Stx-et termelő *E. coli* törzsekre külön elnevezés, az STEC (Shiga-toxin producing *E. coli*) vagy VTEC (Vero-cytotoxin producing *E. coli*) terjedt el.

Mind az EHEC, mind az STEC törzsek esetében az Stx-en és a LEE-n kódolt virulenciafaktorokon kívül további tényleges és potenciális virulenciafaktorokat azonosítottak az elmúlt években; ezt nagyban segítették a fontosabb járványtörzsek teljes genom szekvencia meghatározási projektjei, mint például a O157:H7 Sakai törzsé (Hayashi et al., 2001a), a spenótból származó, szintén jelentős járványt okozó származó O157:H7 TW14359 törzsé (Kulasekara et al., 2009), vagy a 2011-ben Németországban járványt okozott O104:H4 törzseké (Brzuszkiewicz et al., 2011).

E virulenciafaktorok közül feltétlenül megemlítendő az 1.1.3. alfejezetben röviden ismertett pO157 plazmidon található számos virulenciafaktor (Lim et al., 2010), vagy az 1.3 alfejezetben részletesen ismertetett long polar fimbria (Lpf, Torres et al., 2002). Termelhetnek az EHEC törzsek továbbá citotoxinokat is, mint például a sejtciklus gátló faktor (cell cycle inhibition factor, röviden Cif, Marchès et al., 2003), a szubtiláz (Paton et al., 2004), vagy az 1.4. alfejezetben részletesen tárgyalt CDT.

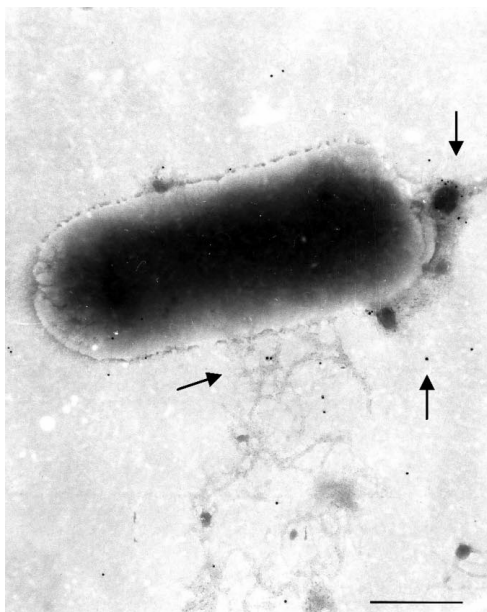
Tóth et al. (2009b) hazai szarvasmarha-állományokat vizsgáltak O157-es szerocsoportú törzsek jelenlétére, ennek során a vizsgált minták 8%-ában találtak patogén *E. coli* törzseket, megerősítve azt, hogy a szarvasmarha e törzsek rezervoárjaként szolgál. Számos O157:H7 EHEC törzs mellett sok, ugyanebbe a szerotípusba tartozó, ám *stx* géneket nem hordozó törzset találtak, melyeket így EPEC-nek kellett tekinteni. Izoláltak ezeken kívül olyan, O157 szerocsoportba tartozó törzseket is, melyek más csillóantigénnel rendelkeztek, és nem tartalmaztak sem *stx*, sem az intimint kódoló *eae* géneket. E törzsek tehát az O157 szerocsoporton belül új genotípust és patotípust képviseltek, melyre a szerzők atípusosként hivatkoztak (Tóth et al., 2009b). Az atípusos O157 törzsek többsége hordozta és termelte a CDT-V toxint, valamint rendelkezett a long polar fimbriát (Lpf) kódoló génnel is.

Mivel az értekezésben ismertetett kísérletes munka során az atípusos *E. coli* O157 törzsek fent említett virulenciafaktorait jellemeztük, ezért fontos részletesen áttekinteni az Lpf-fel és CDT-vel kapcsolatban rendelkezésre álló ismereteket, melyet rendre az 1.3. és 1.4. alfejezetekben teszünk meg.

1.3. Long polar fimbria

1.3.1. Felfedezés és nevezéktan

A long polar fimbriák (röviden Lpf) az O157:H7 szerotípusú EHEC törzsek teljes genom szintű szekvencia meghatározásával (Hayashi et al., 2001a, Perna et al., 2001) párhuzamosan felfedezett (Torres et al., 2002), genetikailag a *Salmonella* serovar Typhimurium 1-es típusú fimbriájához hasonló adhezinek. Az elnevezés arra utal, hogy polárisan, azaz a sejt végén elhelyezkedő, hosszú (900 nm), hajszálszerű struktúrák (1. ábra). Először az Lpf1 típust jellemezték, (Torres et al., 2002), majd nem sokkal később az Lpf2-t (Torres et al., 2004). Az előbbi kódoló *lpf1* operon hat, (*lpf1A*, *lpf1B*, *lpf1C*, *lpf1C'*, *lpf1D*, *lpf1E*, 2. ábra), az utóbbit kódoló *lpf2* operon öt génből áll (*lpf2A*, *lpf2B*, *lpf2C*, *lpf2D*, *lpf2D'*, 2. ábra), rendre mintegy 5,5 és 4,5 kb hosszúságban. Az *lpf1* az O141-es genomi szigeten (O island 141, OI141), az *lpf2* pedig az O154-esen (O island 154, OI154) helyezkedik el. A *Salmonella* Typhimurium 1-es típusú fimbriájával fennálló homológiák okán feltételezhető, hogy az *lpfA* egy nagyobb fimbria alegységet kódol, míg az *lpfB* terméke dajkafehérjeként (chaperon) szolgál, az *lpfC* pedig a külső membránban tölt be horgonyzó (usher) szerepet. Az *lpfD*, valamint a csak az Lpf1-ben jelen levő *lpfE* gén kisebb fimbria alegységeket kódolnak (Torres et al., 2002, Doughty et al., 2002, Torres et al., 2004). A gének hossza az *E. coli* O157:H7 Sakai törzs (Hayashi et al., 2001a, GenBank hozzáférési szám: BA000007.2) esetében rendre 846 bp (A), 384 bp (B), 2535 bp (C), 1071 bp (D) és 1083 bp (E). Az *lpf1* operont tartalmazó O141-es genomi sziget jellegzetes integrációs helye a *yhjW* és *yhjX* nevű, ismeretlen funkciójú fehérjéket kódoló gének közt van. Az O154-es sziget és így az *lpf2* a *pstS* és *glmS* gének közt helyezkedik el, előbbi egy periplazmás foszfát-kötő fehérjét, az utóbbi pedig az L-glutamin-D-fruktóz-foszfát amino-transzferáz enzimet kódolja (2. ábra).



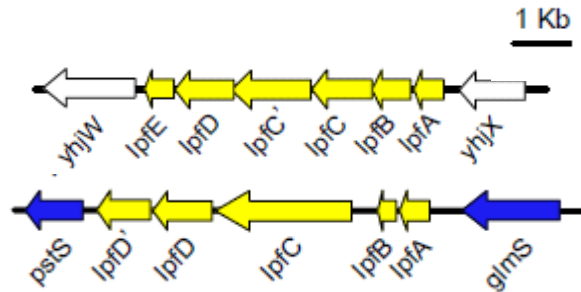
1. ábra. Long polar fimbriák megjelenése az EDL933 jelzésű O157:H7 EHEC törzs *hns* génre mutáns vonalából (AC425) származó sejt felszínén, immunogold jelölést követően, Torres et al. (2008) transzmissziós elektronmikroszkóppal készült felvételén.

A jobb alsó sarokban a jelzés hossza 500 nm-nek felel meg.

E két fimbria-operonnak a következő években számos homológját találták meg különböző patogén *E. coli* törzsekben. Doughty et al. (2002) még ugyanabban az évben egy LEE-negatív O113:H21 szerotípusú STEC törzsben írtak le egy, az *lpf2*-höz nagyon hasonló, az *lpf2ABCD* gének homológjaiból álló operont, melyet ők *lpf_{O113}*-nak nevezték el. Newton et al. (2004) nyulak EPEC törzseiben (rabbit EPEC, REPEC) találták meg mindkét operon homológját, és rendre *lpf_{R141}*-nek és *lpf_{R154}*-nek nevezték el őket. Az előbbi az *lpf1ABCDE* gének homológjait tartalmazta, az utóbbi génösszetétele megegyezett az *lpf_{O113}*-mal. Az O26:H11 STEC törzsből kimutatott *lpf1* homológot *lpf_{O26}*-nak nevezték el (Bardiau et al., 2009), a legtöbb EHEC törzsben pedig az *lpf1* homológok elnevezése *lpf_{O141}*, az *lpf2* homológjaié pedig *lpf_{O154}* volt (Toma et al., 2006).

A meglehetősen nehezen áttekinthető nevezéktant igyekeztek egységesíteni és következetesebbé tenni Torres et al. (2009), akik az adatbankokban rendelkezésre álló *lpfA* gén szekvenciák alapján az *lpfA1* esetében 5, az *lpfA2* esetében összesen 3 allélt különítettek el. Ezen allélok elnevezése az *lpfA1* esetében rendre *lpfA1-1*, *lpfA1-2*, *lpfA1-3*, *lpfA1-4*, *lpfA1-5*, az *lpfA2* esetében hasonló módon *lpfA2-1*, *lpfA2-2*, *lpfA2-3*. A szerzők ezen allélokra egy PCR alapú tipizáló sémát is kidolgoztak, melybe az egyes alléloknak megfelelően a teljes operonok besorolhatók. A korábban *lpf_{O113}*-nak nevezett változat így az új rendszerben *lpf2-1*, az *lpf_{O26}* pedig *lpf1-2*. A más törzsekben talált és a közleményben (Torres et al., 2009) vizsgált, korábban általában csak a genomi szigetre utaló (O141 illetve

O154) jelzéssel ellátott, vagy csak az 1 és 2 számokkal jelölt *lpf* operonokat is meg tudták feleltetni a szerzők az öt illetve három allélikus változat valamelyikének.



2. ábra. Az EDL933 jelzésű, O157:H7 szerotípusú EHEC típusörzs *lpf* operonjainak felépítése Ideses et al. (2005) szerint. Felül az *lpf1*, alul az *lpf2* operon génsorrendje látható. A *yhjW* és *yhjX* gének feltételezett fehérjéket kódolnak, a *pstS* egy periplazmás foszfát-kötő fehérjét, a *glmS* pedig az L-glutamin-D-fruktóz-foszfát amino-transzferáz enzimet.

1.3.2. Az Lpf elterjedtsége

Az Lpf mindkét típusát kimutatták számos különböző szero- és patotípust képviselő, valamint kommenzalista *E. coli* törzsből. Mivel az előző alfejezetben említett egységes, allél alapú nevezéktant (Torres et al., 2009) az Lpf-ek felfedezését követően jóval később javasolták, ezért az alábbiakban főleg a régebbi közlemények esetén az egyes változatokra a szerzők által az adott közleményben alkalmazott jelzésekkel hivatkozunk.

Osek et al. (2003) az *lpf*_{O113}-at megtalálták szarvasmarha- és sertés eredetű O157:NM STEC törzsekben és egy mind *stx*-re, mind *eae*-re negatív szarvasmarha eredetű O157:NM törzsből is. Toma et al. (2004) összesen 139 törzset vizsgáltak az akkor ismert *lpf*_{O141}, *lpf*_{O154} és *lpf*_{O113} jelenlétére. Azt találták, hogy a két előbbi együtt kizárólag az O157:H7 és O157:NM STEC törzseket jellemzi, az *lpf*_{O141}-et ezen kívül csak O145:NM törzsek hordozták. 101 törzs hordozta az *lpf*_{O113}-at, melyek a számos szero- és patotípust képviseltek. Shen et al. (2005) részben ugyanezen törzseket vizsgálva az O157:H7 és O157:NM törzsek esetében megerősítették a két *lpf* operon, az O145:NM törzseknél pedig az *lpf*_{O141} jelenlétét. Southern blot módszerrel sikerült kimutatniuk néhány *lpf* gén jelenlétét más szerotípusú törzsekből is, ám PCR-alapú vizsgálatok azt mutatták, hogy azok teljes operont nem hordoztak (Shen et al., 2005).

Az *lpf*_{O113}-at O78 szerocsoportba tartozó, emberi szeptikémiás esetekből izolált ExPEC, valamint NMEC törzsekből is kimutatták (Ideses et al., 2005). Toma et al. (2006) a fenti változatok mellett az *lpf*_{O26} jelenlétét is ellenőrizték 97, hasmenéses megbetegedésből

származó, változatos szero- és patotípusokat képviselő *E. coli* törzsben, valamint a DECA (Diarrheagenic *E. coli* Collection) és ECOR (*E. coli* Reference Collection) referencia törzsgyűjteményekben. Az *lpf*_{O113}-at és *lpf*_{O26}-ot és minden vizsgált patotípusból (EAEC, EIEC, STEC, EPEC, ETEC) legalább egy törzsben megtalálták, közülük az *lpf*_{O113} volt a gyakoribb; Az *lpf*_{O141} és *lpf*_{O154} az EAEC és EIEC törzsekben nem volt jelen (Toma et al., 2006). Későbbi vizsgálatok azt mutatták, hogy az *lpf*_{O113} a LEE-negatív STEC törzsek jellemző virulenciafaktora (Cergole-Novella et al. 2007, Galli et al., 2010a, Galli et al., 2010b).

Az 1.3.1 alfejezetben említett tipizáló séma fejlesztésekor a szerzők különböző szerotípusú EPEC és EHEC törzseket vizsgáltak az *lpf* változatok jelenlétére (Torres et al., 2009). Úgy találták, hogy az *lpfA1-3* és *lpfA2-2* allélok egyértelmű markerei az O157:H7 és O157:NM STEC törzseknek, valamint az O157:H7 szerotípus ősének tekintett (Feng et al., 2007) O55:H7 szerotípusú törzseknek. A többi változatot számos különböző szerotípusú EPEC és EHEC törzsben megtalálták, a leggyakoribb kombináció az *lpfA1-2* és *lpfA2-1* operonok együttes előfordulása volt, mely a LEE-negatív STEC törzsekre volt jellemző. Összefüggést találtak ezen kívül a törzsek intimin-típusa és a hordozott *lpf* allél típusok között is, egyik legjellemzőbb volt az, hogy az O55:H7 és O157:H7 szerotípusú törzsek minden esetben az *lpfA1-3* és *lpfA2-2* allélokat, valamint az intimin- γ típusát hordozták; míg az *lpfA1-2* és *lpfA2-1* együttes hordozása intimin- β vagy intimin- ϵ típusok hordozásával járt együtt.

1.3.4. Az Lpf szerepe az adhézióban

Az Lpf felfedezése után nem sokkal Jordan et al. (2004) egy, az az Lpf1-et és Lpf2-t egyaránt hordozó O157:H7 törzs esetében úgy találták, hogy az Lpf2 segíti a baktérium adhézióját sertések és juhok bélcsatornájában.

Egy REPEC törzs esetében azt találták, hogy a fertőzés korai szakaszában az Lpf hozzájárul az adhézióhoz (Newton et al., 2004). Hathetes bárányok kísérleti fertőzése egy O157:H7 EHEC törzs Lpf1-re, Lpf2-re, illetve mindkét Lpf-re mutáns, valamint vad típusú változataival azt mutatta, hogy az Lpf-ek segítik a baktérium hosszú távú megtelepedését az állatok bélcsatornájában (Torres et al., 2007a). Ugyanilyen mutáns törzsek segítségével növendéknyulak esetében is hasonló eredmények születtek (Lloyd et al., 2012).

Fitzhenry et al. (2006) szintén egy O157:H7 EHEC törzs Lpf-jeinek hatását vizsgálták *in vitro* humán bélszakaszokon és HEp-2 sejteken. Eredményeik azt mutatták, hogy míg a HEp-2 sejtekhez az Lpf-hiányos mutánsok kevésbé tapadtak, a humán bélszakaszok közül az Lpf mutánsok nemcsak a vastagbélcszakaszok, hanem a vékonybélcszakaszok esetében is

okoztak jellegzetes A/E léziókat – ellentétben a vad típussal, mely csak a vastagbélből származó szakaszokban okozta e jellegzetes elváltozást. A szerzők ebből arra következtettek, hogy az Lpf az adhézió elősegítése mellett a baktériumok megtelepedésének helyét is meghatározza (Fitzhenry et al., 2006). Ugyanebben a munkában megvizsgálták a törzsek génexpressziós mintázatát, és ugyan egyértelmű magyarázatot nem találtak a jelenségre, de kimutattak antagonizmust a *fimG* által kódolt I-es típusú pilus és az Lpf expressziója között (Fitzhenry et al., 2006).

Az Lpf-ek 37 °C-on történő tenyésztés esetén, pH=6,5 mellett a késői exponenciális növekedési fázisban expresszálódnak (Torres et al., 2002, Torres et al., 2007b, Rojas-López et al., 2011). Az Lpf1 expressziója EHEC O157:H7 törzsekben a LEE-n kódolt *ler* gén termékének, a Ler fehérjének, valamint a *hns* gén által kódolt H-NS fehérjének a kontrollja alatt áll, az utóbbi csendesítő (silencer), az előbbi a csendesítést feloldó (anti-silencer) funkcióval bír (Torres et al., 2007a). Ugyancsak az EHEC O157:H7 törzs esetében az Lpf1 a hemagglutináció kialakulásában is szerepet játszik (Torres et al., 2008).

A fentiek mellett sokáig nyitott kérdés volt az Lpf és a gazda célsejtjeinek kölcsönhatása, az Lpf esetleges receptorának megléte. Farfan et al. (2011) igazolták, hogy az EHEC O157:H7 által termelt Lpf1 az extracelluláris mátrix fehérjéihez kötődik, T84 sejteken pedig az adhézióban játszott szerepét is demonstrálták. Az Lpf2 pontos működési mechanizmusa és adhézióban játszott szerepe továbbra is nyitott kérdés, különösen az olyan törzsekben, melyek csak ezt a változatot hordozzák, más ismert adhezinnel, mint például intiminnel, pedig nem rendelkeznek.

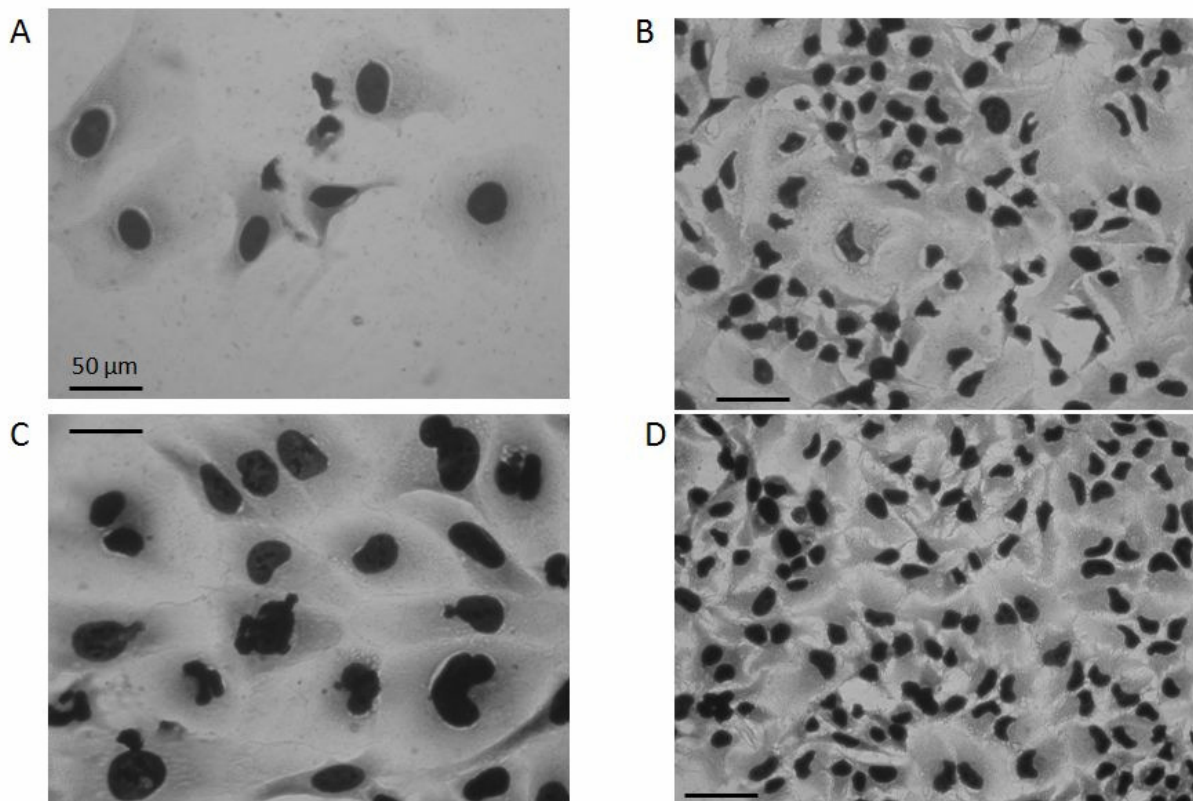
1.4. Citoletális duzzasztó toxinok

1.4.1. Felfedezés és nevezéktan

Johnson és Lior (1988) hasmenéses gyermekekből izolált, O128 szerocsoportba tartozó *E. coli* törzsek citotoxicitását vizsgálták kínai aranyhórcsög petefészek (chinese hamster ovary, CHO) sejttenyészeteken. A kezelt CHO sejtek 24 órán belül jellegzetes megnyúlt morfológiát mutattak, 72 órán belül pedig óriási, egymagvú sejtek alakultak ki, melyek 5-7 nap után elpusztultak (3. ábra). Ezen specifikus sejtmorfológiai változás miatt az új virulenciafaktort citoletális duzzasztó toxinnak (cytolethal distending toxin, CDT) nevezték el. A CDT lett az első képviselője a később gátló hatású ciklomodulinoknak nevezett toxincsoportnak (Oswald et al., 2005, Nougayréde et al., 2005). Az azóta eltelt bő két évtized során a CDT-t számos kórokozó *E. coli* törzsből kimutatták, valamint számos más Gram-negatív állati és emberi kórokozóban is megtalálták homológjait, mint például az

Aggregatibacter actinomycetemcomitans, *Haemophilus ducreyi*, *Shigella* sp., *Campylobacter* sp., *Helicobacter* sp., és a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium törzsekben (Jinadasa et al., 2011, Gargi et al., 2012).

A CDT-k széles körű elterjedtsége miatt szükségessé vált egy nevezéktan bevezetése a különböző fajok által termelt CDT-k pontos megnevezésére. Az értekezés további részében a Jinadasa et al. (2011) által javasolt legújabb rendszert fogjuk követni, ebben a toxint hordozó organizmust a genus-név első betűje és a fajnév első három betűje jelöli – így például a *Campylobacter jejuni* által hordozott CDT megnevezése CjejCDT, az *E. coli* által hordozottaké EcolCDT. Az EcolCDT-knek öt genetikai típusa ismert, melyeket egy korábban kialakult rendszer szerint római számmal jelölünk, CDT-I-től CDT-V-ig. Mivel a következő fejezetekben elsősorban az EcolCDT-kről lesz szó, amennyiben ismert a szóban forgó toxin típusa, azokra e régebbi módon fogunk hivatkozni.



3. ábra. A citoletális duzzasztó toxin specifikus citopátiás hatása.

HeLa sejtenyészetekről 72 órás inkubációt követően Giemsa-festést követő fénymikroszkóppal készült felvétel. A jelzés mindegyik képen 50 µm-nek felel meg. A, E6468/62 enteropatogén *Escherichia coli* törzs által termelt CDT-I hatása; B, HB101 *E. coli* K12 törzsszel kezelt HeLa tenyészet; C, E250 madár patogén *E. coli* (avian pathogenic *E. coli*, APEC) törzs által termelt CDT-IV hatása; D, kezeletlen HeLa sejtek. Tóth I. felvétele.

1.4.2. Az CDT elterjedtsége *E. coli* törzsekben

Az *E. coli* törzsek esetében CDT-termelést számos különböző szero- és patotípusba tartozó törzsekben mutatták ki. A CDT-termelő *E. coli* törzsek által képviselt patotípusok közt megtaláljuk STEC és EHEC (Bielaszewska et al., 2004, Orth et al., 2006), EPEC (Pandey et al., 2003, Tóth et al., 2003), UPEC (Nagy et al., 2000, Tóth et al., 2003, Dubois et al., 2010), NTEC (Nagy et al., 2000, Van Bost et al., 2001), az NMEC (Johnson et al., 2002), valamint ExPEC (Tóth et al., 2003, Bielaszewska et al., 2004) és APEC törzseket is (Johnson et al., 2007, Tóth et al., 2012). CDT-t termel ezeken kívül számos olyan törzs is, melyeket nem lehet az ismert patotípusokba besorolni (Okeke et al., 2000, Tóth et al., 2009b). Beszámoltak olyan patogén *E. coli* törzsekről is, melyeknek a CDT az egyetlen azonosított virulenciafaktora. Ezen törzsekre vezették be előbb a „CLDTEC” (Okeke et al., 2000), majd a CTEC (Hinenoya et al., 2009) rövidítést (mindkettő a „cytolethal distending toxin producing *E. coli*”-nak felel meg). Az CTEC törzsek közös jellemzője volt, hogy öt évesnél fiatalabb hasmenéses gyermekekből származtak (Okeke et al., 2000, Hinenoya et al., 2009). Az alábbiakban áttekintjük az egyes CDT típusok elterjedtségét a kórokozó *E. coli* törzsekben.

A CDT-I főleg az EPEC törzsekben fordul elő, gyakran jellemzi az O127:H7 és O86a:H34 szerotípusú törzseket (Pandey et al., 2003, Asakura et al., 2007, Kim et al., 2009). CDT-I-et gyakran termelnek uropatogén törzsek is (Dubois et al., 2010), valamint STEC törzsekben is kimutatták (Bouzari et al., 2005). Izoláltak CDT-I termelő törzseket bárány- és sertéstetemekből vett kenetektől is, melyek az O22, O139, O147 és O149 szerocsoportokat képviselték (Kadhun et al., 2006); valamint szeptikémiás csirkéből (Johnson et al., 2007).

A CDT-II-t elsősorban olyan törzsekből mutatták ki, melyek humán emésztőrendszeri fertőzéseket okoznak (Pickett et al., 1994, Hinenoya et al., 2009). Magyarországon CDT-II termelő törzset tudomásunk szerint eddig nem azonosítottak.

A CDT-III az elsősorban szarvasmarha eredetű, és főképp az O127 szerocsoportba tartozó NTEC törzsek jellemző toxinja (Van Bost et al., 2001, Clark et al., 2002, Tóth et al., 2003, Orth et al., 2006, Ghanbarpour és Oswald, 2009). Ennek oka, hogy az operon ugyanazon konjugatív virulencia plazmidon (Johnson et al., 2010), és azon belül is ugyanazon a PAI-n (Pérès et al., 1997) helyezkedik el, mint az e törzsek másik jellegzetes toxin génjét, a citotoxikus nekrotizáló faktor 2-es típusát kódoló *cnf2*. CDT-III termelő törzseket izoláltak szeptikémiás sertésekből (Tóth et al., 2003), valamint szarvasmarha- és sertéstetemekből vett kenetektől is (Kadhun et al., 2006). Borriello et al. (2012) vízibivaly borjakban találtak CDT-III termelő NTEC törzseket.

A CDT-IV-et elsősorban extraintesztinális, mind állati, mind humán eredetű *E. coli* törzsekből mutatták ki (Tóth et al., 2000; 2003; 2009a). Az állati eredetű törzsek részben választási hasmenéses malacokból (Tóth et al., 2000), részben szeptikémiás sertésekből származtak (Tóth et al., 2003). Kimutattak CDT-IV-et baromfi szeptikémiából származó törzsekből is (Tóth et al., 2003), valamint CDT-IV termelő törzseket találtak szarvasmarha-, bárány-, és sertéstetemekből származó mintákban (Kadhum et al., 2006). A változatos gazda- és betegség spektrumnak megfelelően a CDT-IV termelő *E. coli* törzsek számos szerotípust reprezentálnak (Tóth et al. 2000; 2003; Kadhum et al., 2006). E törzsek gyakran hemolizáló, és sokszor termelik a citotoxikus nekrotizáló faktor 1-es típusát is (Tóth et al., 2003).

A CDT-V-termelés leginkább a humán eredetű O157-es EHEC és nem-O157-es STEC törzsek jellemzője (Janka et al., 2003), de kimutatták egészséges szarvasmarhákból származó STEC (Orth et al., 2006), valamint ugyanilyen eredetű atípusos (*stx* és *ea* negatív) *E. coli* O157 törzsekben (Tóth et al., 2009b). A CDT-V gyakran megtalálható a szorbitbontó (SF) O157:NM STEC törzsekben is (Janka et al., 2003, Bielaszewska et al., 2004, Osek, 2005, Kim et al., 2009, Wu et al., 2010). Noha a CDT-V-öt azonosították egyéb szerotípusú törzsekben is (Hinenoya et al., 2009, Tóth et al., 2009b), de az O157:NM STEC törzsekben eddig ez az egyetlen azonosított CDT-típus (Bielaszewska et al., 2004). A fentiekén kívül egy viszonylag ritka szerotípust jelentő O91:H21 STEC törzsek 70%-a is hordozta a CDT-V-öt (Bielaszewska et al., 2009).

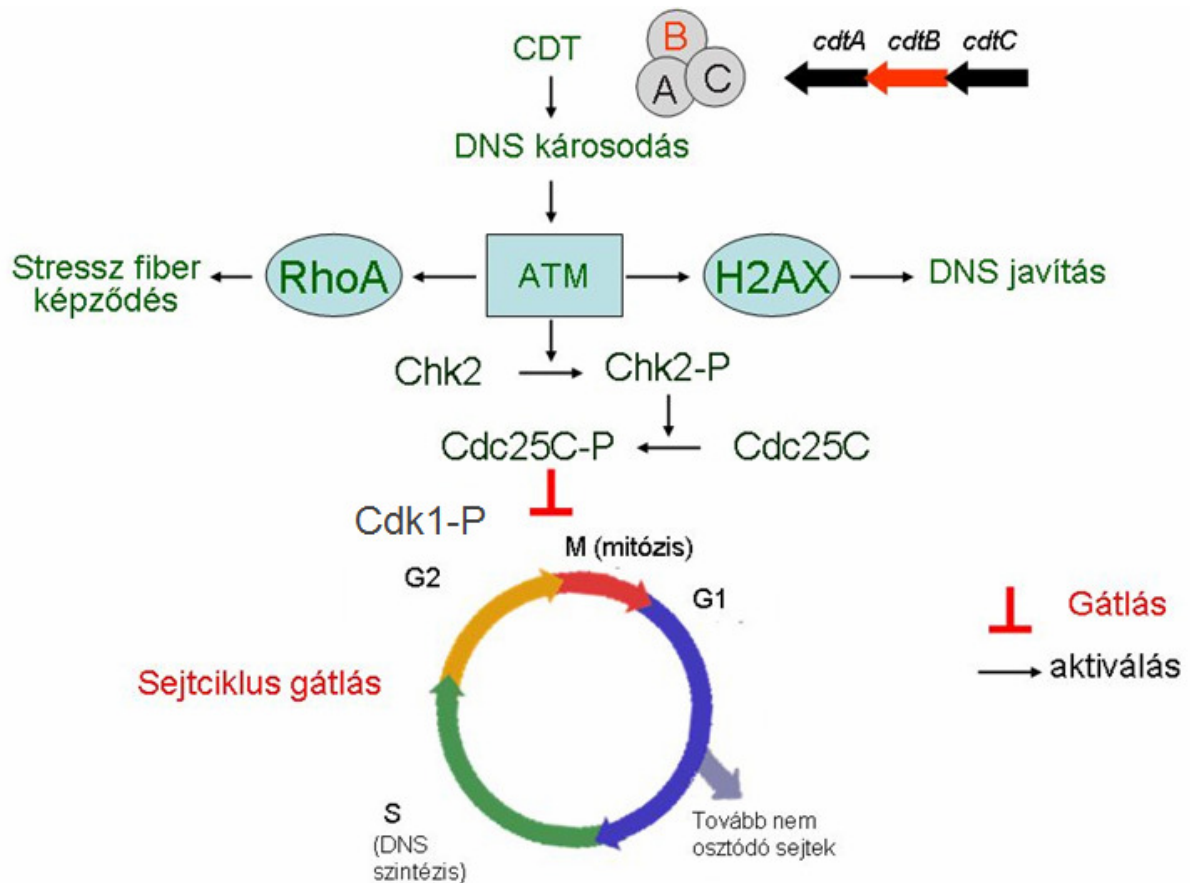
1.4.3. A CDT hatásmechanizmusa

A CDT három fehérje alegységből álló, heterotrimer felépítésű toxin, melyben a CdtB fehérje az aktív alegység, míg a CdtA és CdtC fehérjék az általános modell szerint a CdtB-nek a célsejtbe való eljuttatására szolgálnak (Lara-Tejero és Galán, 2001). A CDT fehérjéket a *cdtABC* operon kódolja, mely az alegységeket kódoló, három egymást követő, részben átfedő génből áll. Az *E. coli* esetében a *cdtA*, *cdtB* és *cdtC* gének hossza rendre 714-777, 810-822, illetve 546-573 bázispár (GenBank számok: *cdt-I* U03293.1, *cdt-II* U04208.1, *cdt-III* U89305.1, *cdt-IV* AY578329.1, *cdt-V* AJ508930.1). Az egyes gének által kódolt fehérjék tömege rendre 27, 29, ill. 20 kDa (Scott és Kaper, 1994).

A CdtB az emlősök DNáz-I enzimével mutat jelentős hasonlóságot (Elwell és Dreyfus, 2000) és DNáz aktivitását számos *in vitro* kísérlet igazolta (Lee et al., 2003, Haghjoo és Galán, 2004). Az *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* által termelt CDT (AactCDT) kristályszerkezetének modellezése megmutatta, hogy a CdtB-ben megtalálhatók az emlős DNáz-I-ével megegyező konzervált aminosavak (Nesić et al., 2004).

A CdtB célsejtbe való bejutásának mechanizmusa még nem ismert minden részletében, mivel specifikus receptorát ez idáig nem sikerült azonosítani. Ennek oka részben az lehet, hogy számos CDT esetében fajspecifitás figyelhető meg az érzékeny sejtvonalak célmolekuláit illetően (Eshraghi et al., 2010). A közelmúltban azonban tisztázódott néhány kulcsfontosságú molekula szerepe a CDT-nek a célsejtbe való kapcsolódásában. A CDT-II-nek a célsejtbe való kötődésében a fukóz játszhat szerepet (McSweeney és Dreyfus, 2005), továbbá CDT-II holotoxint a baktérium külső membrán vezikulumokban (outer membrane vesicle, OMV) bocsátja ki (Berlanda Scorza et al., 2008). A CDT-III-nak a CHO sejtekhez való tapadáshoz a fukóz mellett szüksége van koleszterinre és glikoszfinolipidekre is a célsejt membránjában (Boesze-Battaglia et al., 2006). A célsejtbe került CdtB alegység a Golgi-készüléken és az endoplazmatikus retikulumon keresztül retrográd transzporttal jut el a sejtmagig (Cortes-Bratti et al., 2000, Guerra et al. 2005, Guerra et al., 2009). E folyamatban nagy valószínűséggel szerepe van a CDT-II esetében már felfedezett, a CdtB C-terminális közelében levő nukleáris lokalizációs szignálnak is (McSweeney és Dreyfus, 2004).

Miután a CdtB elérte a célsejt magját, ott duplaszálú töréseket okoz annak DNS-ében. A DNS károsodás következtében ataxia telangiectasia mutated (ATM) kináztól függő (Cortes-Bratti et al., 2001) kaszkád folyamat indul el, melynek végeredményeként *in vitro* körülmények között az emlős sejtek osztódása a sejtciklus G2 fázisában, közvetlenül a mitózis előtt leáll (Comayras et al., 1997, Cortes-Bratti et al., 2001). Ezen szignáltranszdukciós folyamatról ad áttekintést a Heywood et al. (2005) közleményének nyomán készült 4. ábra. Az osztódásukban megakadályozott sejtek kromoszóma állománya 4N, amely áramlási citofluorimetriával jól követhető (Pérès et al., 1997, Comayras et al., 1997, Cortes-Bratti et al., 2001, Bielaszewska et al., 2005, Tóth et al. 2009a). Noha az eddig vizsgált mesenchymális eredetű (CHO, HeLa) sejtvonalak sejtciklusa CDT hatására többnyire a G2/M fázisban áll le, fibroblaszt eredetű sejtekben a G1/S fázisban bekövetkezett sejtciklus blokkolásról is beszámoltak (Hassane et al., 2003, Belibasakis et al., 2004). Több kísérlet is igazolta, hogy hematopoietikus eredetű sejtvonalak (MOLT, Jurkat-T) jóval érzékenyebbek a CDT-re, mint a mesenchymálisak, és az apoptózis is jóval hamarabb, 96 órán belül bekövetkezik az esetükben (Cortes-Bratti et al., 2001, Belibasakis et al., 2004, Shenker et al., 2007).



4. ábra. A CDT-k hatásmechanizmusának összefoglalója Heywood et al. (2005) nyomán.

A célsejtbe bejutott aktív alegység, a CdtB károsítja a sejt DNS állományát, ezzel pedig aktiválja az ataxia telangiectasia mutated (ATM) kinázt, mely elindít egy kaszkádot. Ez a folyamatsor a checkpoint kináz 2-n (Chk2) és a cdc25-ön keresztül a ciklin-függő kináz 1 (Cdk1) foszforilált állapotban maradásához, és így a sejtciklus leállításához vezet a G2 és M fázis között. Az ATM ezeken kívül aktiválja a hibajavításért felelős H2AX hisztonokat, valamint a stressz fiberek kialakulását elindító RhoA (Ras fehérje homológ A) fehérjét is.

1.4.4. A CDT lehetséges szerepe a patogenezisben

Irodalmi adatok szerint a CDT-nek a fertőzés akut fázisában nincs jelentős szerepe (Lewis et al., 2001, Young et al., 2001, Wising et al., 2005). Több állatmodellen demonstrálták azonban, hogy krónikus fertőzésekben a CDT-nek fontos funkciója van. A *Campylobacter jejuni* invázióját a CjejCDT jelentősen segíti mind az ún. súlyos kombinált immunhiányos (severe combined immune deficiency; SCID) egerekben (Purdy et al., 2000), a nekrosis faktor κ B-hiányos egerekben (Fox et al., 2004), valamint a mucin-hiányos egerekben (McAuley et al., 2007) is. Ezen krónikus modellekben a CDT egy gyulladós jellegű immunválasz kialakulását segíti elő. Jinadasa et al. (2011) szerint az ilyen immunválasz,

noha segíti a gazda védekezését az inváziós baktériumok ellen, egyúttal fokozza is azok ürítését, és így elősegítheti terjedésüket. A CDT által kiváltott krónikus gyulladás pedig összefüggésben lehet a karcinogenezissel is (Guerra et al., 2011).

A sejtosztódás gátlása a különböző CDT-termelő baktériumok fertőzési folyamatát különböző módokon segítheti. A *Campylobacter*hez köthető vastagbélgyulladás esetében, a fentebb említett mechanizmus szerint a CDT a baktérium kolonizációját segíti (Purdy et al., 2000, Fox et al. 2004, McAuley et al., 2007). Mint ahogy arról az előző alfejezetben is szó volt, a hematopoietikus eredetű sejtvonalak különösen érzékenyek a CDT-re, ebből adódik a következtetés, hogy a CDT-termelő baktérium valószínűleg a gazda immunválaszát befolyásolja a toxinnal (Shenker et al., 2007, Guerra et al., 2011). A *Haemophilus ducreyi* esetében ezzel összhangban feltételezik, hogy az immunválasz gyengítésével (Wising et al., 2005) és a regenerációs folyamatok lassításával járulhat hozzá a toxin a betegség súlyosbodásához. A CDT ilyen jellegű potenciális szerepét a *Helicobacter hepaticus* által egerekben okozott bélgyulladás, *H. ducreyi* által okozott lágyfekély, valamint az *A. actinomycetemcomitans* által okozott fogínygyulladás esetében Guerra et al. (2011) vázolták fel részletesen.

E. coli esetében nem állnak rendelkezésre a fenti három fajhoz hasonlóan kidolgozott modellek a CDT lehetséges szerepéről a patogenezisben. Heywood et al. (2005) összefoglaló közleményükben feltételezik, hogy a CDT-termelő *E. coli* törzsek valószínűleg opportunista kórokozók, és a CDT hatásának nem közvetlenül a bélhámom való megtelepedésben van szerepe. A különböző patotípusú *E. coli* törzsek esetében pedig az egyéb virulenciafaktorok hatásával párhuzamosan nehéz megfigyelni és elkülöníteni a specifikusan a CDT-hez köthető hatásokat (Oswald et al., 2005). A CDT patogenezisben játszott szerepét azonban az epidemiológiai adatok valószínűsítik, hiszen a CDT-t súlyos megbetegedésekből származó patogén *E. coli* törzsek széles skálájából izolálták (Janka et al., 2003, Bielaszewska et al., 2004, Hinenoya et al., 2009, Dubois et al., 2010). Ezen eredményekkel összhangban Pandey és munkatársai (2003) különböző sejtenyészeteken vizsgálva az általuk izolált *E. coli* törzsek CDT-hatását azt találták, hogy a súlyosabb tüneteket mutató betegekből izolált törzsek CDT-hatása drasztikusabb volt. Mindezen adatok arra mutatnak, hogy a CDT valóban fontos virulencia-faktora a patogén *E. coli* törzseknek, a betegség kialakulásában betöltött pontos szerepe azonban még nem ismert, és az egyes patotípusok esetében valószínűleg különböző.

1.4.5. Az EcolCDT genetikája

Az *E. coli* törzsek CDT-inek típusai génjeik szekvenciája alapján két fő filogenetikai csoportba oszthatók, az egyik csoportot a CDT-I és -IV típusok alkotják, a másikat a CDT-II, -III, -V típusok (Tóth et al., 2009a). A két fő csoport tagjai az egyes gének hosszában is különböznek egymástól: a *cdtA*, *cdtB* és *cdtC* gének hossza rendre 714, 822 és 573 bp a *cdt-I* és *cdt-IV* esetében, míg a *cdt-II*, *cdt-III* és *cdt-V* operonok megfelelő génjeinek hossza 777, 810 és 546 bp.

A *cdtB* szekvenciája jóval konzerváltabb, mint a *cdtA* és *cdtC* géné. Ez arra utal, hogy az aktív CdtB alegységen jóval nagyobb a szelekciós nyomás, ami valószínűsíti a CDT virulenciafaktor szerepét. Az eddig megismert *cdt* operonok mind mobilis genetikai elemek részei, vagy kapcsolódnak mobilis genetikai elemekhez (1. táblázat).

A humán EPEC O127:H7 és O142:H6 törzsekben a *cdt-I* operon egy 60 kb méretű indukálható lambdoid profág genomjában foglal helyet, e profágban a *cdt*-n kívül megtalálható egy másik citotoxin, a Cif génje is (Asakura et al., 2007).

A *cdt-III* operon a pVir68 nevű nagyméretű plazmidon foglal helyet, azon belül is egy patogenitási szigeten, melynek része több más virulenciafaktort kódoló gén és operon, úgy mint a *cnf2*, az F17b fimbria génjei, a *tibAC* fimbria-kódoló operon, és hemolizin gének (Pérès et al., 1997, Johnson et al., 2010).

A *cdt-IV* operont a *cdt-I*-éhez nagyon hasonló lambdoid profág gének határolják, (Tóth et al., 2009a), ez is egybecseng a többi típushoz képest szorosabb rokonsággal. A legteljesebb információt egy madár patogén *E. coli* törzs, az APEC O1 teljes genom szekvenciája adta (Johnson et al., 2007). E törzs genomjában a *cdt-IV* operont két profág határolja, valamint tRNS gének és egy patogenitási sziget. A profágok struktúrgénjei nagy hasonlóságot mutatnak az Stx2 fágok génjeivel, ám a lambdoid profágon belül a *cdt* operon integrációs helye is más, mint a hasonló szerkezetű Stx2 fágok genomján belül az *stx* géneké (Johnson et al., 2007).

A *cdt-V* operont az O157:NM és O157:H7 szerotípusú STEC törzsekben (Janka et al., 2003), valamint változatos szerotípusokat képviselő CTEC törzsekben (Hinenoya et al., 2009) P2-szerű profág-gének határolják. Környezeti eredetű O157:H7, O91:H21 és más szerotípusú STEC törzsekből sikerült indukálható P2-szerű, *cdt-V* hordozó fágokat is izolálni, azonban a *cdt-V* hordozó törzsek többségében a CDT fág nem bizonyult indukálhatónak (Allué-Guardia et al., 2011). Hasonló eredményről számoltak be a *cdt-I* hordozó lambdoid profágok esetében is (Asakura et al., 2007). Ezen eredmények arra utalnak, hogy a *cdt-V* hordozó P2-fágok szekvenciája heterogén.

Általában az *E. coli* törzsek *cdt* operonjának idegen eredetére utal GC arányuk is, mely 41 és 44% közötti, azaz jóval alacsonyabb, mint az *E. coli* genom átlagos GC aránya (50,8%;

Touchon et al., 2009). Ezek az adatok is arra mutatnak, hogy a HGT jelentős szerepet játszhatott a CDT terjedésében és genetikai típusainak jelenlegi eloszlásában.

1. táblázat. Az *E. coli* által termelt CDT-k elterjedtsége és genetikai háttere

CDT típus	Eredet, patotípus	Szerocsoport / típus	<i>cdt</i> lokalizációja	Hivatkozás
I	humán EPEC, ExPEC, bárány, sertés, csirke szeptikémia	O86:H34, O127:H7, O18:K1:H1	kromoszóma, lambdoid profág	Asakura et al., 2007; Tóth et al., 2009a
II	humán EPEC	O128:NM	kromoszóma	Pickett et al., 1994
III	szarvasmarha szeptikémia, NTEC	O115:K?:H21, O2, O8, O78, O86, O88, O136, O159, O171	plazmidon kódolt patogenitási sziget	Pèrés et al., 1997; Johnson et al., 2010
IV	sertés hasmenés és szeptikémia, baromfi szeptikémia, humán ExPEC	O75:K191, O2, O6, O115, O141, O149, O164, O170	kromoszóma, lambdoid profág	Tóth et al., 2003; Tóth et al., 2009a
V	EHEC, STEC, szarvasmarha atípusos	O157:H7/NM, O73:H18, O91, O113, O153, O157:H43	kromoszóma, P2-szerű profág	Janka et al., 2003; Hinenoya et al., 2009

1.5. Célkitűzések

Munkánk célja volt az *stx*- és *eae* negatív (atípusos) szarvasmarha eredetű *E. coli* O157 törzsek virulenciafaktorainak megismerése és részletes jellemzése. Az általunk vizsgált és változatos szerotípusokat reprezentáló atípusos *E. coli* O157 törzsek többsége termelt CDT-t és rendelkezett Lpf2-vel, éppen ezért jelen értekezés keretében a következőket elemeztük:

Lpf2 (*lpf2*) esetében

- vizsgálni kívántuk az *lpf* operonok elterjedtségét különböző patotípusú *E. coli* O157 törzsek körében
- az *lpf* operonok tipizálásával és szekvenálásával kívántuk meghatározni ezen virulencia faktort kódoló operon diverzitását
- az *lpf* operonok határoló régióinak szekvencia analízisével kívántuk megismerni az *lpf* operon vektorát és ezen vektorok elterjedtségét kívánjuk monitorozni különböző patotípusú *E. coli* törzsekben

CDT (*cdt-V*) esetében

- meg kívántuk ismerni a rendelkezésünkre álló atípusos szarvasmarha eredetű *E. coli* O157 törzseink *cdt-V* génjeinek és határoló régióinak nukleotid szekvenciáját
- célunk volt továbbá, hogy amennyiben, ahogy arra az eddigi szakirodalomból következtetni lehet, valóban P2-szerű profág hordozza a *cdt-V* operont, úgy meghatározzuk a P2-szerű fág genom összetételét egy *E. coli* O157:H43 törzsben
- modell törzsünk fág genomjának ismeretében további szekvenálással és génbanki szekvenciák analízisével igyekeztünk képet kapni a P2-szerű fágok evolúciójáról

Teljes genom szekvencia meghatározás

- teljesebb, az egész genomra kiterjedő információ szerzése céljából meg kívántuk ismerni a T22 jelzésű, O157:H43 szerotípusú törzs teljes genomi szekvenciáját.

2. Az *lpf* operon tipizálása EHEC, EPEC és atípusos *E. coli* törzsek, valamint az ECOR törzsgyűjtemény tagjainak körében

2.1. Bevezetés

Mivel, fel kívántuk deríteni az atípusos *E. coli* O157 törzsek *lpf* operonjainak genetikai diverzitását, elsőként az *lpf* operonok pontos típusát kellett meghatározni. E célra kézenfekvő volt a Torres et al. (2009) által közölt PCR alapú tipizáló sémát alkalmazni. Egyúttal tesztelni is kívántuk e séma hatékonyságát típusos virulenciafaktor készlettel bíró EHEC és EPEC törzsek körében, valamint a korábban, más PCR primerekkel *lpf* gének jelenlétére vizsgált (Toma et al., 2006) ECOR referencia törzsgyűjtemény tagjainak körében is. A vizsgálatban szereplő törzsek többségének fő virulencia génjeit korábbi munkákban már jellemezték, ám néhány törzs esetében ezt nekünk kellett elvégeznünk az alábbi, 2.2 alfejezetben részletezett fenotípusos és genotípusos vizsgálatok segítségével.

2.2. Anyagok és módszerek

2.2.1. Baktériumtörzsek

A felhasznált *E. coli* O157 és egyéb szerotípusú kontrolltörzsek listáját a 3. táblázat tartalmazza. A Kuvaitból származó O157:H7 törzseket Pál Tibor (UAE University, Dubai, Egyesült Arab Emírátságok) izolálta és bocsátotta rendelkezésünkre. A 493/89, 702/88 és 703/88 jelzésű, Németországban izolált EHEC O157:NM törzseket Helge Karch-tól kaptuk. A szintén Németországban izolált, és egyéb tulajdonságokra már vizsgált EHEC törzseket (Mellmann et al. 2008), szintén Helge Karch bocsátotta rendelkezésünkre. Az ugyancsak Németországban izolált 3538 jelzésű törzset Herbert Schmidt-től kaptuk, a 662-es törzset Lancz Zsuzsanna (NÉBIH Állategészségügyi Igazgatóság) izolálta egészséges szarvasmarha tejéből. Az ECOR törzseket részünkre Kerényi Mónika biztosította (Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézet).

2.2.2. Fenotípusos vizsgálatok

A törzseket lysogeny broth (LB) agar és bróm-timolkék (BTK) táptalajokon (Sambrook et al., 1989) egy éjszakán át 37 °C-on tenyésztettük. A korábban nem tipizált törzsek

szerotípusát O157 latex agglutinációval (Oxoid) és H7 antigén elleni hiperimmun savóval (Tóth et al., 1991) ellenőriztük. A törzsek motilitását LB lágy agar táptalajon (a normál LB agar táptalajjal szemben itt az agaróz csak 0,5%-os koncentrációjú) teszteltük, a szorbitbontási képességüket pedig 1% szorbitol tartalmú MacConkey táptalajon (Farmer és Davis, 1985) történő egyéjszakás tenyésztést követően értékeltük.

2.2.3. Genotipizálás

2.2.3.1. DNS-izolálás

A PCR reakciókhoz szükséges DNS-t egyéjszakás tenyészetekből állítottuk elő az alábbi módon. Néhány jellegzetes telepet steril desztilláltvízben szuszpendáltunk, majd 20 percig forraltuk őket, végül a minták 10.000 g gyorsulással történő 2 perces centrifugálását követően lenyert felülúszóit használtuk templátként.

A PCR reakciókat T3 Thermocycler készülékben (Biometra) végeztük, a primereket részben a Csertex Kft.-vel (Budapest), részben a Sigma-Aldrich Kft.-vel (Budapest) szintetizáltattuk. A reakciókban a Fermentas (Vilnius, Litvánia) által gyártott Taq DNS polimerázt használtuk. A felhasznált primerek szekvenciáit a 2. táblázat tartalmazza. A PCR termékeket GR Safe (Bio-Rad, Hercules, USA) festékkel kiegészített 1%-os agarózgélen, TAE pufferben (Sambrook et al., 1982) vetettük alá elektroforézisnek, 100 V állandó feszültséggel. A futtatást követően a géleket UV fényes átvilágítás mellett, Kodak Gel Logic 212 géldokumentációs rendszerrel, a Kodak Molecular Imaging Software program 5.0.1.27-es verziójának segítségével dokumentáltuk.

2.2.3.2. PCR reakciók

Az egyes Lpf struktúrgének jelenlétét az Lpf1 esetében a Shen et al. (2005), az Lpf2 esetében az Ideses et al. (2005) által publikált primerek és protokoll szerint végeztük. Az *lpfA* allél-tipizálást a Torres et al. (2009) által kidolgozott sémát követve végeztük, minden allélna külön reakcióval. Az *stx1*, *stx2* és *eae* gének jelenlétét a China et al. (1996) által közölt primerekkel és protokollal ellenőriztük, itt pozitív kontrollként az EHEC O157:H7 Sakai törzs (Hayashi et al., 2001a) szerepelt. Az *eae*-pozitív törzsek esetében az intimin- γ típus meglétét Oswald et al. (2000) szerint ellenőriztük, a pozitív kontroll itt szintén a Sakai törzs volt. Az ETEC törzsek hőstabil és hőlabilis toxin génjeire specifikus PCR-eket Alexa et al. (1997)

szerint végeztük, e reakciókban pozitív kontrollként a 2173-as jelzésű törzs (Nagy et al., 1997) szerepelt.

A törzsek filogenetikai tipizálását a Clermont et al. (2000) által kidolgozott triplex PCR-rendszerrel, az általuk közölt primerek felhasználásával végeztük.

A munkánk ezen szakaszában használt primereket – az *lpf* tipizálásban használtakhoz hasonlóan – a 2. táblázatban foglaltuk össze. A reakciók általános hőmérsékleti profilja egy 3 percig tartó 94 °C-os kezdeti denaturációból állt, majd 30 cikluson keresztül az alábbiak következtek: 45 s denaturáció 94 °C-on, 45 s annealáció az adott primernek megfelelő hőmérsékleten, végül 1 perc extenzió 72 °C-on. A reakciókat általában egy 5 perces végső extenzió zárta.

2. táblázat, 1. rész. Az *lpf* tipizálásban és a 2. fejezetben szereplő egyéb genotipizálásokban felhasznált primerek

Primer név	Szekvencia (5'-3')	Felerősített szakasz	Hivatkozás
LPFA1-AF	AGTTGGTGATAAATCACCAT	<i>lpf1</i> , 1-es allél	Torres et al., 2009
LPFA1-AR	GTGCTGGATTCACTACTATTCATCG		
LPFA1-B1F	AAGTCTGTATTTACTGCTATG	<i>lpfA1</i> , 2-es allél	Torres et al., 2009
LPFA1-B1R	GAAATACAGAACGGTCTGA		
LPFA1-3-CF	GGTTGGTGACAAATCCCCG	<i>lpf1</i> , 3-as allél	Torres et al., 2009
LPFA1-3-CR1	CGTCTGGCCTTTACTCAGA		
LPFA1-B2F	AAGTCTGTGTTTACCACTACT	<i>lpf1</i> , 4-es allél	Torres et al., 2009
LPFA1-B2R	AAAATACAGAACAGTCTGG		
LPFA1-5-CF	GGTTGGTGACAAATCCCCG	<i>lpf1</i> , 5-ös allél	Torres et al., 2009
LPFA1-5-CR1	GAGAACCGTCTGGCCTGTTT		
LPFA2-B1F	GGTAGTCTGGCGTCGCCACAGA	<i>lpf2</i> , 1-es allél	Torres et al., 2009
LPFA2-B1R	AATACGAATACCAACGCCG		
LPFA2-CF	CTACAGGCGGCTGATGGAACA	<i>lpf2</i> , 2-es allél	Torres et al., 2009
LPFA2-CR	GCTAATACCAGCGGCAGCATCGT		
LPFA2-B2F	GGTAGTCTGGCGTCACCACAGC	<i>lpf2</i> , 3-as allél	Torres et al., 2009
LPFA2-B2R	AATACGAATACCGACACCC		
Z4965-R1	AGTGGCCTGAGTGTGACGAC	<i>lpf1</i> , <i>lpfE</i> gén	Shen et al., 2005
Z4965-F1	GTTGCCTGCGGGGTGAATG		
Z4966-R1	GTGACACGCCCTGAATAGATAC	<i>lpf1</i> , <i>lpfD</i> gén	Shen et al., 2005
Z4966-F1	CGCGGATGGCACGACTTA		
Z4968m-F1	CAAAAGCAACGCCGAAGTCAG	<i>lpf1</i> , <i>lpfC</i> gén	Shen et al., 2005
Z4968m-R1	GGCTATCGCGATCGTTATTCAG		
Z4969-F1	GTAAATTTGTTGCGTTGGCTCTC	<i>lpf1</i> , <i>lpfB</i> gén	Shen et al., 2005
Z4969-R1	ATTTGGCGCGTTTTTACATC		

2. táblázat, 2. rész. Az *lpf* tipizálásban és a 2. fejezetben szereplő egyéb genotipizálásokban felhasznált primerek

Primer név	Szekvencia (5'-3')	Felerősített szakasz	Hivatkozás
Z4971-F1	TACAGGCGAGATCGTGGATTCAC	<i>lpf1</i> , <i>lpfA</i> gén	Shen et al., 2005
Z4971-R1	GACCTGCGCATTGCCGTAAC		
Z5220-F1	CCTGCTCCCGGTATGGTTTAT	<i>lpf2</i> , <i>lpfE</i> gén	Shen et al., 2005
Z5220-R1	CTTGCCCGGCCGGTAGATG		
Z5221-F1	TATGGTTTCGCCGCTAATGGTG	<i>lpf2</i> , <i>lpfD</i> gén	Shen et al., 2005
Z5221-R1	GGCGACTTCCGTTGTGGGTAT		
Z5222-F1	GGGGCTACCTGGTACTGGAC	<i>lpf2</i> , <i>lpfC</i> gén	Shen et al., 2005
Z5222-R1	ATCGCCGCCGCTACTGGT		
Z5224-F	CGCAGATGTCGATGGCTACG	<i>lpf2</i> , <i>lpfB</i> gén	Shen et al., 2005
Z5223-R1	CGTCTTTATCATCCACCGTCACA		
Z5225-F1	CCTTTAGTGGCGTCGATGATGT	<i>lpf2</i> , <i>lpfA</i> gén	Shen et al., 2005
Z5225-R1	CTGCGAGTCGGCGTTAGC		
lpfA F	ACCGCTATCGATGCTGAAGG	<i>lpf2</i> , <i>lpfA</i> – <i>lpfB</i> gének	Ideses et al., 2005
lpfB R	GCGCAACATCTTCGGGAATA		
lpfC F2	CGCCGGGTTAGAAATAGATA	<i>lpf2</i> , <i>lpfC</i> – <i>lpfD</i> gének	Ideses et al., 2005
lpfD R2	TGCCTGGTTTATTTTTGACGTA		
B52	AGGCTTCGTCACAGTTG	<i>eaeA</i> gén	China et al., 1996
B53	CCATCGTCACCAGAGGA		
B54	AGAGCGATGTTACGGTTTG	<i>stx1</i> gene	China et al., 1996
B55	TTGCCCCCAGAGTGGATG		
B56	TGGGTTTTTCTTCGGTATC	<i>stx2</i> gén	China et al., 1996
B57	GACATTCTGGTTGACTCTCTT		
Chua.1	GACGAACCAACGGTCAGGAT	<i>chuA</i> gén	Clermont et al., 2000
Chua.2	TGCCGCCAGTACCAAAGACA		

2. táblázat, 3. rész. Az *lpf* tipizálásban és a 2. fejezetben szereplő egyéb genotipizálásokban felhasznált primerek

Primer név	Szekvencia (5'-3')	Felerősített szakasz	Hivatkozás
YjaA.1	TGAAGTGTCAGGAGACGCTG	<i>yjaA</i> gén	Clermont et al., 2000
YjaA.2	ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC		
TspE4C2.1	GAGTAATGTCGGGGCATTCA	<i>tspE4C2</i> gén	Clermont et al., 2000
TspE4C2.2	CGCGCCAACAAAGTATTACG		
SK1	CCCGAATTCGGCACAAGCATAAGC	<i>eae</i> intimin- γ specifikus régió	Oswald et al., 2000
LP3	CCCGAATTCTTATTCTACACAAACCGC		
stb _{fw}	TCTTCTTGCATCTATGTTCG	ST toxin gén b alegység	Alexa et al., 1997
stb _{rev}	TCTCTAACCCCTAAAAAAC		
lt _{fw}	TTACGGCGTACTATCCTCTCTA	LT toxin gén	Alexa et al., 1997
lt _{rev}	GGTCTCGGTCAGATATGTGATTC		

2.3. Eredmények

2.3.1. A vizsgálatban szereplő törzsek fő patogenetikai jellemzői

Összesen 97, részben emberi megbetegedésekből (n=54), részben egészséges szarvasmarhából (n=43) származó *E. coli* O157 törzset, valamint az ECOR gyűjtemény 72 tagját vizsgáltuk meg *lpf* gének jelenlétére. Az ECOR gyűjteményen kívüli törzsek három patotípusba voltak sorolhatók: EHEC, EPEC, és a sem *stx*-et, sem *eae* gént nem hordozó atípusos törzsek. A munkánkban szereplő EHEC törzsek mindegyike hordozta legalább az *stx2* gént, és a 4979 jelzésű kivételével az *stx1*-et is. A három Németországból származó O157:NM törzs szorbitol-fermentáló volt, a többi EHEC törzs azonban nem. A törzsek eredetét, szerotípusát, patotípusát, Lpf allél-kombinációját és filogenetikai csoportosítását foglalja össze a 3. táblázat.

A 662, PT81, PT155 és PT282 jelzésű törzseket szerotipizáltuk, teszteltük motilitásukat, valamint az *stx1*, *stx2* és *eae* virulencia gének jelenlétét. Mindegyik törzs mozgóképesnek bizonyult, H7 antigént hordozott, valamint az *eae* génből a γ változatot termelte. A PT81 és PT282 *stx2*-pozitív volt, míg a 662 és PT155 nem hordoztak *stx*-et, ezért míg a két előbbi kuvaiti törzs EHEC patotípusba sorolható, a két utóbbi törzs EPEC-nek tekintendő.

A vizsgált EHEC és EPEC törzsek mind a D filogenetikai csoportba tartoztak. Az atípusos O157 szerocsoportú törzsek közül hat a B1, három az A csoport tagjának bizonyult (3. táblázat).

3. táblázat, 1. rész. Atípusos, enterohemorrhagiás és enteropatogén *E. coli*, valamint típustörzsek filogenetikai csoportjai és *lpf* allél típusai

Patotípus	Eredet	Származási ország	Törzs száma	Szerotípus	Filogenetikai csoport	<i>lpfA1</i> allél	<i>lpfA2</i> allél	Hivatkozás
Atípusos	egészséges szarvasmarha	Magyarország	B20	O157:H12	A	-	-	Tóth et al., 2009b
	egészséges szarvasmarha	Magyarország	B54	O157:H12	A	-	1	Tóth et al., 2009b
	egészséges szarvasmarha	Magyarország	T4	O157:H12	A	-	-	Tóth et al., 2009b
	egészséges szarvasmarha	Magyarország	B47	O157:NM	B1	-	1	Tóth et al., 2009b
	egészséges szarvasmarha	Magyarország	T22	O157:H43	B1	-	1	Tóth et al., 2009b
	egészséges szarvasmarha	Magyarország	T16	O157:H43	B1	-	1	Tóth et al., 2009b
	egészséges szarvasmarha	Magyarország	T50	O157:H43	B1	-	1	Tóth et al., 2009b
	egészséges szarvasmarha	Magyarország	T34	O157:H9	B1	-	1	Tóth et al., 2009b
	egészséges szarvasmarha	Magyarország	T49	O157:H37	B1	-	1	Tóth et al., 2009b
EHEC	egészséges szarvasmarha	Magyarország	34	O157:H7	D	3	2	Tóth et al., 2009b
	egészséges szarvasmarha	Magyarország	52	O157:H7	D	3	2	Tóth et al., 2009b
	egészséges szarvasmarha	Magyarország	254	O157:H7	D	3	2	Tóth et al., 2009b
	egészséges szarvasmarha	Magyarország	R4	O157:H7	D	3	2	Tóth et al., 2009b
	egészséges szarvasmarha	Magyarország	R67	O157:H7	D	3	2	Tóth et al., 2009b
	egészséges szarvasmarha	Magyarország	F67	O157:H7	D	3	2	Tóth et al., 2009b
	egészséges szarvasmarha	Magyarország	318	O157:NM	D	3	2	Tóth et al., 2009b
	egészséges szarvasmarha	Magyarország	319	O157:NM	D	3	2	Tóth et al., 2009b
	egészséges szarvasmarha	Magyarország	320	O157:NM	D	3	2	Tóth et al., 2009b
	egészséges szarvasmarha	Magyarország	321	O157:H7	D	3	2	Tóth et al., 2009b
	egészséges szarvasmarha	Magyarország	4979	O157:H7	D	3	2	Tóth et al., 2009b
EPEC	egészséges szarvasmarha	Magyarország	64	O157:H7	D	3	2	Tóth et al., 2009b
	egészséges szarvasmarha	Magyarország	65	O157:H7	D	3	2	Tóth et al., 2009b
	egészséges szarvasmarha	Magyarország	67	O157:H7	D	3	2	Tóth et al., 2009b
	egészséges szarvasmarha	Magyarország	68	O157:H7	D	3	2	Tóth et al., 2009b
	egészséges szarvasmarha	Magyarország	103	O157:H7	D	3	2	Tóth et al., 2009b
	egészséges szarvasmarha	Magyarország	121	O157:H7	D	3	2	Tóth et al., 2009b
	egészséges szarvasmarha	Magyarország	122	O157:H7	D	3	2	Tóth et al., 2009b
	egészséges szarvasmarha	Magyarország	127	O157:H7	D	3	2	Tóth et al., 2009b

3. táblázat, 2. rész. Atípusos, enterohemorrhagiás és enteropatogén *E. coli*, valamint típustörzsek filogenetikai csoportjai és *lpf* allél típusai

Patotípus	Eredet	Származási ország	Törzs száma	Szerotípus	Filogenetikai csoport	<i>lpfA1</i> allél	<i>lpfA2</i> allél	Hivatkozás
EPEC	egészséges szarvasmarha	Magyarország	129	O157:H7	D	3	2	Tóth et al., 2009b
	egészséges szarvasmarha	Magyarország	137	O157:H7	D	3	2	Tóth et al., 2009b
	egészséges szarvasmarha	Magyarország	138	O157:H7	D	3	2	Tóth et al., 2009b
	egészséges szarvasmarha	Magyarország	144	O157:H7	D	3	2	Tóth et al., 2009b
	egészséges szarvasmarha	Magyarország	165	O157:H7	D	3	2	Tóth et al., 2009b
	egészséges szarvasmarha	Magyarország	168	O157:H7	D	3	2	Tóth et al., 2009b
	egészséges szarvasmarha	Magyarország	169	O157:H7	D	3	2	Tóth et al., 2009b
	egészséges szarvasmarha	Magyarország	174	O157:H7	D	3	2	Tóth et al., 2009b
	egészséges szarvasmarha	Magyarország	177	O157:H7	D	3	2	Tóth et al., 2009b
	egészséges szarvasmarha	Magyarország	178	O157:H7	D	3	2	Tóth et al., 2009b
	egészséges szarvasmarha	Magyarország	179	O157:H7	D	3	2	Tóth et al., 2009b
	egészséges szarvasmarha	Magyarország	R6	O157:H7	D	3	2	Tóth et al., 2009b
	egészséges szarvasmarha	Magyarország	R30	O157:H7	D	3	2	Tóth et al., 2009b
	egészséges szarvasmarha	Magyarország	F30	O157:H7	D	3	2	Tóth et al., 2009b
egészséges szarvasmarha	Magyarország	662	O157:H7	D	3	2	jelen értekezés	
EHEC	humán megbetegedés	Németország	3538	O157:H7	D	3	2	Tóth et al., 2009b
	humán megbetegedés	Kuvait	PT81	O157:H7	D	3	2	jelen értekezés
	humán megbetegedés	Kuvait	PT282	O157:H7	D	3	2	jelen értekezés
	humán megbetegedés	Magyarország	C81	O157:NM	D	3	2	Tóth et al., 2003
	humán megbetegedés	Magyarország	171	O157:H7	D	3	2	Mag et al., 2010
	humán megbetegedés	Magyarország	773	O157:NM	D	3	2	Mag et al., 2010
	humán megbetegedés	Magyarország	898	O157:NM	D	3	2	Mag et al., 2010
	humán megbetegedés	Magyarország	53	O157:NM	D	3	2	Mag et al., 2010
	humán megbetegedés	Magyarország	C83	O157:NM	D	3	2	Mag et al., 2010
	humán megbetegedés	Magyarország	600	O157:NM	D	3	2	Mag et al., 2010
	humán megbetegedés	Németország	702/88	O157:NM	D	3	2	Tóth et al., 2009a
	humán megbetegedés	Németország	703/88	O157:NM	D	3	2	Tóth et al., 2009a
	humán megbetegedés	Németország	493/89	O157:NM	D	3	2	Karch et al., 1993
	humán megbetegedés	Németország	3232/96	O157:H7	D	3	2	Mellmann et al., 2008

3. táblázat, 3. rész. Atípusos, enterohemorrhagiás és enteropatogén *E. coli*, valamint típustörzsek filogenetikai csoportjai és *lpf* allél típusai

Patotípus	Eredet	Származási ország	Törzs száma	Szerotípus	Filogenetikai csoport	<i>lpfA1</i> allél	<i>lpfA2</i> allél	Hivatkozás
EHEC	humán megbetegedés	Németország	3817/96	O157:NM	D	3	2	Mellmann et al., 2008
	humán megbetegedés	Németország	4391/96	O157:H7	D	3	2	Mellmann et al., 2008
	humán megbetegedés	Németország	6830/96	O157:H7	D	3	2	Mellmann et al., 2008
	humán megbetegedés	Németország	16147/96	O157:NM	D	3	2	Mellmann et al., 2008
	humán megbetegedés	Németország	1760/97	O157:H7	D	3	2	Mellmann et al., 2008
	humán megbetegedés	Németország	1608/97	O157:H7	D	3	2	Mellmann et al., 2008
	humán megbetegedés	Németország	5049/97	O157:NM	D	3	2	Mellmann et al., 2008
	humán megbetegedés	Németország	1759/97	O157:H7	D	3	2	Mellmann et al., 2008
	humán megbetegedés	Németország	4367/97	O157:H7	D	3	2	Mellmann et al., 2008
	humán megbetegedés	Németország	4427/97	O157:H7	D	3	2	Mellmann et al., 2008
	humán megbetegedés	Németország	4589/97	O157:H7	D	3	2	Mellmann et al., 2008
	humán megbetegedés	Németország	4264/98	O157:H7	D	3	2	Mellmann et al., 2008
	humán megbetegedés	Németország	3320/98	O157:NM	D	3	2	Mellmann et al., 2008
	humán megbetegedés	Németország	3226/98	O157:NM	D	3	2	Mellmann et al., 2008
	humán megbetegedés	Németország	1695/99	O157:NM	D	3	2	Mellmann et al., 2008
	humán megbetegedés	Németország	1867/99	O157:H7	D	3	2	Mellmann et al., 2008
	humán megbetegedés	Németország	4309/99	O157:NM	D	3	2	Mellmann et al., 2008
	humán megbetegedés	Németország	4424/99	O157:H7	D	3	2	Mellmann et al., 2008
	humán megbetegedés	Németország	1855/00	O157:NM	D	3	2	Mellmann et al., 2008
	humán megbetegedés	Németország	2442/00	O157:NM	D	3	2	Mellmann et al., 2008
humán megbetegedés	Németország	4301/00	O157:H7	D	3	2	Mellmann et al., 2008	
humán megbetegedés	Németország	E09/87	O157:H7	D	3	2	Mellmann et al., 2008	

3. táblázat, 4. rész. Atípusos, enterohemorrhagiás és enteropatogén *E. coli*, valamint típusörzsek filogenetikai csoportjai és *lpf* allél típusai

Patotípus	Eredet	Származási ország	Törzs száma	Szerotípus	Filogenetikai csoport	<i>lpfA1</i> allél	<i>lpfA2</i> allél	Hivatkozás
EHEC	humán megbetegedés	Németország	E09/115	O157:H7	D	3	2	Mellmann et al., 2008
	humán megbetegedés	Németország	E09/145	O157:H7	D	3	2	Mellmann et al., 2008
	humán megbetegedés	Németország	E09/161	O157:H7	D	3	2	Mellmann et al., 2008
	humán megbetegedés	Németország	E09/185	O157:H7	D	3	2	Mellmann et al., 2008
	humán megbetegedés	Németország	E08/127	O157:H7	D	3	2	Mellmann et al., 2008
	humán megbetegedés	Németország	E08/202	O157:H7	D	3	2	Mellmann et al., 2008
	humán megbetegedés	Németország	E08/217	O157:H7	D	3	2	Mellmann et al., 2008
	humán megbetegedés	Németország	E08/282	O157:H7	D	3	2	Mellmann et al., 2008
	humán megbetegedés	Németország	E08/292	O157:H7	D	3	2	Mellmann et al., 2008
	humán megbetegedés	Németország	E08/325	O157:H7	D	3	2	Mellmann et al., 2008
	humán megbetegedés	Németország	E07/223	O157:H7	D	3	2	Mellmann et al., 2008
	humán megbetegedés	Németország	E07/238	O157:H7	D	3	2	Mellmann et al., 2008
	humán megbetegedés	Németország	E08/111	O157:H7	D	3	2	Mellmann et al., 2008
	humán megbetegedés	Németország	E08/113	O157:H7	D	3	2	Mellmann et al., 2008
	humán megbetegedés	Németország	E07/210	O157:H7	D	3	2	Mellmann et al., 2008
	humán megbetegedés	Németország	E06/457	O157:H7	D	3	2	Mellmann et al., 2008
	humán megbetegedés	Németország	E06/469	O157:H7	D	3	2	Mellmann et al., 2008
EPEC	humán megbetegedés	Kuvait	PT155	O157:H7	D	3	2	jelen értekezés
Típustörzsek			O157:H7 Sakai	O157:H7	D	3	2	Hayashi et al., 2001a
			E2348/69	O127:H6	B2	1		Iguchi et al., 2009

2.3.2 Az *lpf* genotipizálás eredményei

A PCR-alapú vizsgálatok szerint a 97 vizsgált O157 szerocsoportú törzs közül 95 hordozott legalább egy *lpf* operont, ezek közül 88 hordozta mindkét fő változatot. Az *lpf*-pozitív törzsek mindegyike hordozta az operonok összes struktúrgénjét is, igazolva az operonok épségét. Az EHEC és EPEC törzsek az *lpf1* operonból egységesen a 3-as számú, *lpf2*-ből a 2-es számú allélt hordozták. A hét atípusos *lpf*-pozitív törzs csak az *lpf2* 1-es allélját hordozta.

Az ECOR törzsek közül 26 bizonyult *lpf*-pozitívnak, hét törzs csak *lpf1*-et tartalmazott, tizenegy törzs csak *lpf2*-t, és nyolc olyan törzs volt, mely mindkét operont hordozta (4. táblázat).

4. táblázat. Az *lpf*-pozitív ECOR törzsek *lpf* allél típusai

Törzs	Szerotípus	Filogenetikai csoport	<i>lpfA1</i> allél	<i>lpfA2</i> allél
ECOR7	O85:HNT	A		1
ECOR23*	O86:H43	A	2	1
ECOR26	O104:H21	B1	2	1
ECOR27	O104:NM	B1	2	1
ECOR30	O113:H21	B1		1
ECOR31	O79:H43	E	3	
ECOR32	O7:H21	B1		1**
ECOR33	O7:H21	B1		1
ECOR34	O88:NM	B1		1
ECOR36	O79:H25	D	2**	1
ECOR37	ONT:HNT	E	3	2
ECOR38	O7:NM	D		3
ECOR39	O7:NM	D		3
ECOR41	O7:NM	D		3
ECOR4*	ONT:H26	D	5	-
ECOR45	ONT:NM	B1	2	
ECOR46*	O1:H6	D	-	3
ECOR47	ONT:H18	D		3
ECOR57	ONT:NM	B2	2**	1**
ECOR58	O112:H8	B1	2	1
ECOR63	ONT:NM	B2	4**	
ECOR65*	ONT:H10	B2	4	-
ECOR66	O4:H40	B1	2**	
ECOR67	O4:H43	B1		1
ECOR69	ONT:NM	B1	2**	1
ECOR72	O144:H8	B1		1

* Ezen törzseket használtuk pozitív kontrollként az O157-es törzsek tipizálásakor a megfelelő reakcióban.

** E törzsek korábban (Toma et al., 2006) negatívnak bizonyultak az adott *lpf* típusra.

2.4. Megbeszélés

Az *lpf* operon jelentős prevalenciája a vizsgált O157 törzsekben megerősíti a korábbi tanulmányokat, melyek szerint az Lpf elterjedt és fontos virulenciafaktor lehet (Toma et al., 2004, Toma et al., 2006, Torres et al., 2009). Az operonok PCR-rel történő letapogatása minden törzs esetében igazolta, hogy az *lpf* operonok mindegyik génje megvan, ezért azok valószínűleg funkciójukat is betöltik.

Eredményeink harmonizálnak azon korábbi eredményekkel (Toma et al., 2004, Toma et al., 2006, Torres et al., 2009), melyek szerint az O157 szerocsoportba tartozó EHEC és EPEC törzsek mindkét *lpf* operont hordozzák. Az összes O157:H7 és O157:NM törzs, szorbitol-fermentáló tulajdonságtól és az izolálás helyétől függetlenül az *lpfA1-3* és *lpfA2-2* kombinációját hordozta. Torres et al. (2009) már a tipizáló séma publikálásakor felvetették, hogy e kombinációnak marker jellege van az említett virulens szerotípusokra nézve. Itt megjegyzendő, hogy az Lpf-tipizáló séma bevezetésekor a szerzők (Torres et al., 2009), habár számos szerotípust képviselő törzset vizsgáltak, az O157 szerocsoportból kizárólag Dél-Amerikában izolált STEC törzsek szerepeltek munkájukban. A mi vizsgálatainkban 24, részben magyar (Tóth et al., 2009b), részben kuvaiti eredetű EPEC törzs is szerepelt e szerocsoportból, amelyek ugyanazt az allélkombinációt hordozták, mint a hasonlóan O157-es sejtfalantigént termelő EHEC törzsek.

Hét atípusos, az O157 szerocsoporton belül különböző szerotípusokat képviselő, és Magyarországon belül különböző helyeken izolált törzs az *lpfA2-1* allélt hordozta. E tekintetben ezek a törzsek az eddig talált számos, hozzájuk hasonlóan az A és B1 filogenetikai csoportokba tartozó, de más szerotípusokat képviselő törzshöz hasonlóan (Shen et al., 2005, Toma et al., 2006, Torres et al., 2009). Megjegyzendő az is, hogy e törzsek intimin-negatívak (Tóth et al., 2009b), és a H9, H12 és H37 csilló-antigénnel rendelkezők új szerotípusokat képviselnek az Lpf2 pozitív törzsek közt.

Korábban Osek et al. (2003) számos Stx- és intimin-negatív O157:NM törzsből kimutatták az akkor még *lpfA_{O113}*-nak nevezett *lpfA2-1*-et, és feltételezték, hogy szerepet játszhat a törzsek patogenezisében. E törzsekre az általunk vizsgáltak közül a B47 jelzésű hasonlít a leginkább, mely ugyancsak az O157:NM szerotípusba tartozik, és szintén az *lpfA2-1*-et hordozza. Szerotípusát és *lpf* típusát tekintve hasonló izolátum a DEC7E is (Toma et al., 2006), patotípusát tekintve ez azonban ETEC törzs. A DEC7A jelzésű, szintén az ETEC patotípusba tartozó és szorbitobontó O157:H43 törzs (Reid et al., 1999) az általunk vizsgált, ugyanezen szerotípust képviselő, de atípusos és a szorbitot nem bontó törzsekhez hasonlóan szintén az *lpfA2-1*-et hordozza (Torres et al., 2009), valamint a C filogenetikai

csoportba tartozik, mely egy később definiált, az A és B1 csoportokhoz közel álló csoport (Escobar-Páramo et al., 2004).

Az ECOR törzsek közül az ECOR36-ról és az ECOR39-ről ismert volt, hogy *lpf2*-t hordoznak (Toma et al., 2006). A mi vizsgálataink során az új tipizáló rendszerrel *lpf1*-re is pozitívnak bizonyultak (4. táblázat). Az *lpfA1*-et kimutattuk a korábban *lpf*-negatívnak talált (Toma et al., 2006) ECOR63-ban és ECOR66-ban is. A hivatkozott munkában szintén *lpf*-negatívnak bizonyult ECOR32-ben az *lpfA2*-t, az ECOR57-ben pedig mindkét operon vonatkozó szakaszát megtaláltuk. Ezek az eredmények mutatják a tipizáló módszer érzékenységét, ám megjegyzendő, hogy ez a rendszer az operonoknak csak egy-egy rövid, variábilis részét detektálja, és kilenc olyan ECOR törzset is találtunk, melyek Toma et al. (2006) vizsgálatában pozitívak voltak egyik vagy mindkét *lpf* operonra, a tipizáló PCR-ek azonban egyik allél jelenlétét sem tudták az esetükben kimutatni. Utóbbi eredmény arra utal, hogy az *lpf* operonoknak további, eddig nem azonosított allélikus változatai is létezhetnek.

Az *lpfA2-1* változat korábbi munkák által is megerősített széles körű elterjedtsége számos különböző szero- és patotípusban erősen valószínűsíti, hogy a HGT valamely formájának segítségével terjedt el a patogén *E. coli* törzsek között. Az viszont, hogy elsősorban az A és B1 filogenetikai csoportokba tartozó törzsek hordozzák, arra utal, hogy más filogenetikai eredete van, mint az EHEC és EPEC törzsekben (D filogenetikai csoport) található *lpf* operonoknak.

3. Az *lpf2* lókuszt klónoztása és szekvenálása

3.1. Bevezetés

Az *lpf2* operonok diverzitásának meghatározásához a nukleotid szekvenciájuk pontos megismerése volt a következő lépés. Ennek érdekében az *lpf2+* atípusos *E. coli* O157 törzsek közül kiválasztottunk egyet, a T22 jelzésű O157:H43 szerotípusút, és kozmid klónkönyvtárat készítettünk genomjából, megkönnyítendő a kívánt szakasz, vagyis az *lpf2* operon és közvetlen környékének szekvencia-meghatározását. Összehasonlító célból több másik atípusos O157 törzsben is meg kívántuk határozni az *lpf2* operon szekvenciáját, valamint PCR-reakciókkal monitorozni a jellegzetes határoló régiók jelenlétét különböző patotípusokat képviselő *E. coli* törzsek esetében. Meg akartuk válaszolni ezen kívül azt a kérdést, hogy valóban termeli-e az Lpf-et a vizsgált törzs, és funkciós vizsgálatokat is kívántunk végezni, felderítendő, hogy milyen szerepet játszhat az Lpf2 az atípusos *E. coli* O157 törzsek adhéziójában.

3.2. Anyagok és módszerek

3.2.1. Baktériumtörzsek

A munkánk ezen részében felhasznált baktériumtörzsek az eredmények egy részét is tartalmazó 6. táblázatban található felsorolva. Mindegyik szerepelt az Lpf tipizálási munkákban is (3. fejezet), tenyésztési körülményeik is megegyeztek az ott leírtakkal.

3.2.2. Kozmid klónkönyvtár készítése

A T22 törzs genomi DNS-ét a fenol-kloroformos kivonással izoláltuk Sambrook et al. (1982) nyomán, röviden az alábbiak szerint. 100 ml triptonos szója táplevesben (TSB, Sambrook et al., 1989) egy éjszakán át 200 rpm fordulatszámmal rázott tenyészetet 8000 g-vel centrifugáltunk, a felülúszót elöntöttük. A pelletet lízis pufferben (Sambrook et al., 1982) vettük fel, majd a mintához 50 µg/ml koncentrációban proteináz K-t adtunk (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), és 1 órán át 65 °C-on inkubáltuk. Ezek után előbb fenollal, majd fenol és kloroform 1:1 arányú elegyével, végül tisztán kloroformmal mostuk és centrifugáltuk a baktériumsejteket, minden esetben a felülúszóval dolgoztunk tovább. Az utolsó lépés után a

felülúszóból etanollal precipitáltuk a DNS-t, amit végül TE pufferben (Sambrook et al., 1982) vettünk fel. A DNS minőségét 1,2%-os agarózgélben 80 V állandó feszültséggel végrehajtott elektroforézist követően, UV-fényes átvilágítás mellett ellenőriztük. A DNS koncentrációját Qubit Fluorometerrel (Invitrogen) határoztuk meg.

A kozmid klónkönyvtárat pWEB TNC Cosmid Cloning Kit (Epicentre, USA) segítségével a gyártó utasításait egy ponton módosítva készítettük az alábbiak szerint. A genomi DNS-t a gyártó által javasolt mechanikai darabolás helyett *Mbo* I restrikciós endonukleázzal (Fermentas, Vilnius, Litvánia) kezeltük, majd az így kezelt DNS-t ligáltuk a pWEB TNC kozmid vektorral. A ligátumot a kit részét képező fágrészecskékkel (MaxPlax Lambda Packaging Extract, Epicentre, USA) kevertük el a kozmidrészecskék kialakítása céljából, melyekkel ezután az EPI100-T1 jelzésű *E. coli* K-12 törzset fertőztük. A klónok szelekciója 100 µg/ml koncentrációban alkalmazott ampicillinnel történt. Összesen 1000 klón továbboltásával és megőrzésével alakítottuk ki a klónkönyvtárat. A klónok tenyésztése minden esetben szelektív koncentrációjú ampicillinnel kiegészített LB agar táptalajon vagy szintén ampicillinnel kiegészített LB, illetőleg TSB táplevesben történt. A klónokból DNS-t a 2.2.3.1 alfejezetben leírt forralásos módszerrel izoláltunk. Az *lpf2*-pozitív klónok detektálását az Ideses et al. (2005) által leírt PCR reakcióval végeztük.

3.2.3. Reverz transzkripció PCR az *lpfA* génre

Az *lpfA* gén, és ezáltal közvetve az Lpf struktúra expressziójának igazolása céljából RT-PCR-t végeztünk az *E. coli* T22 törzs *lpfA* génjére. Ehhez először RNS-t izoláltunk a T22 törzs 48 órán át 200 rpm fordulatszámmal 37 °C-on rázott tenyészetéből az RNEasy Mini Kittal (Qiagen, Németország) a gyártó utasításainak megfelelően, azzal a módosítással, hogy a sejteket 1 perces, 13.000 g-vel történő centrifugálással gyűjtöttük össze, és a felülúszó leöntése után a pellettel dolgoztunk tovább. Az RNS-mintát DNáz I-gyel (DNase I Amplification Grade, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) is kezeltük a gyártó utasításainak megfelelően µl-enként 0,05 egységnyi enzimmel, kizárandó a DNS-sel történő szennyeződést. Az 5. táblázatban megjelölt primerek segítségével és a Maxima Reverse Transcriptase enzim (Fermentas, Vilnius, Litvánia) felhasználásával végeztük a reverz transzkripciót, majd az így kapott terméket használtuk templátként ugyanezekkel a primerekkel végzett PCR reakciókban, melyeket Platinum Taq polimerázzal (Sigma-Aldrich) végeztünk. A reakció hőprofilja hasonló volt a 2.2.3.2 fejezetben leírthoz, ám a denaturáció ez esetben 98 °C-on történt.

5. Táblázat, 1. rész. Az *lpf2* operon határoló régióinak monitorozását célzó PCR reakciókban felhasznált primerek.

E primereket a jelzettek kivételével jelen értekezés alapján szolgáló munkánk során terveztük.

Primer	Szekvencia (5'-3')	Felerősített gének	Referencia szekvencia génbanki száma	Felerősített pozíció	Annelációs hőmérséklet (°C)
bgIGfw	CCCAAGCGCTCCTGCGCTAAA	<i>bgIG-phoU</i>	CU928160.2	3977599-3978492	60
phoUrev phoUfw	TCTGGAGTCGCTGGGCCGTC CGATCACGCGCTTCGCCAGA	<i>phoU-pstB</i>	CU928160.2	3978707-3979162	59
pstBrev pstBfw	GGTATCGCCATTCGCCCGGA GGACGGCCCGATAAACGCCG	<i>pstB-pstA</i>	CU928160.2	3979526-3979912	60
pstArev pstAfw	CAGCCGATCGCCAACCTGCC AGCCAGAACAGGCCGAAGGC	<i>pstA-pstC</i>	CU928160.2	3980508-3980919	59
pstCrev pstCfw	ATCGGCGGCATCATGCTGGG ACCGTAGATCGGCACCAGCG	<i>pstC-pstS</i>	CU928160.2	3981370-3981924	58
pstSrev pstSfw	CCAGAAAGGCGAAGATGCATGGC CAGACAGCGGCGCGTCAGAG	<i>pstS-lpfD</i>	CU928160.2	3982472-3983233	58
lpfDrev lpfAfw	TGCTACCGAACCCAATACGGACAA TGTCGACAATTTACCGACGAAGTG	<i>lpfA-glmS</i>	CU928160.2	3987849-3988769	58
glmSrev glmSfw	GCTGCCGAGCCGTATTGAGCA CGTGTGTCGCCAGCGAGTA	<i>glmS-glmU</i>	CU928160.2	3989854-3990519	58

5. Táblázat, 2. rész. Az *lpf2* operon határoló régióinak monitorozását célzó PCR reakciókban felhasznált primerek.

E primereket a jelzettek kivételével jelen értekezés alapján szolgáló munkánk során terveztük.

Primer	Szekvencia (5'-3')	Felerősített gének	Referencia szekvencia génbanki száma	Felerősített pozíció	Annelációs hőmérséklet (°C)
glmUrev glmUfw	GGCGATGCGGAAATTGGCGA AGCAGATCGCCGCCGTGAC	<i>glmU-atpC</i>	CU928160.2	3991436-3992119	59
atpCrev lpfA F*	ACGAAGCGCGAGCCATGGAA ACCGCTATCGATGCTGAAGG	<i>lpfB-lpfA</i>	AY057066	678-1349	63
lpfB R* lpfC F2*	GCGCAACATCTTCGGGAATA CGCCGGGTTAGAAATAGATA	<i>lpfD-lpfC</i>	AY057066	3658-4421	53
lpfD R2* lpfA_inside_fw**	TGCCTGGTTTATTTTTGACGTA TCGACAGTAAATTGTGAATC	<i>lpfA</i> egy része	AY057066	233-790	50
lpfA_inside_rev**	GAAGCGTAATATTATAGGCG				

*Ideses et al., 2005.

**A reverz transzkripció PCR-ben felhasznált primerek.

3.2.4. Szekvencia-meghatározás

Egy, a PCR-szűrés alapján az *lpf2* operont hordozó kozmid klónból kozmid-DNS-t izoláltunk a GenElute BAC DNA kit (Sigma-Aldrich) segítségével a gyártó utasításainak megfelelően. A szekvencia-meghatározást a BayGen Intézetben végeztük SOLiD 4 és IonTorrent újgenerációs szekvenáló platformok, valamint kiegészítésként Sanger-féle didezoxinukleotid módszer segítségével. Az RT-PCR termékeinek szekvenciáját szintén az utóbbi módszerrel határoztuk meg. A T22 törzs *lpf2* operonjának szekvenciájára alapozva, és szintén a Sanger-féle módszerrel a B47, B54, T16, T34, T49 és T50 törzsek *lpf2* operonjának szekvenciáját is meghatároztuk. A szekvenciák analízise, az ORF-ek és szekvencia homológiák keresése részben az NCBI honlapján elérhető eszközökkel (BLAST különböző algoritmusai), részben a Vector NTI és a CLC Bio Genomic Workbench programokkal történt.

3.2.5. Adhéziós vizsgálatok

Az *E. coli* T22 törzs potenciális adhézióját primer szarvasmarha vese- és here sejtenyészeteken vizsgáltuk, melyeket Szállás Emília (NÉBIH Állategészségügyi Igazgatóság) készített elő és bocsátott rendelkezésünkre. A sejteket 24 lyukú lemezekben 37 °C-on, 5% CO₂-t tartalmazó atmoszférában, RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640) táplevesben összefüggő, egy sejtnyi vastagságú réteg kialakulásáig növesztettük, majd PBS-sel (phosphate buffer saline, Sambrook et al., 1982) mostuk. A C600 és a T22 törzsek 48 órán keresztül 37 °C-on 200 rpm fordulatszámmal rázott tenyészetekből minden lyukba kb. 10¹⁰ sejtet adtunk RPMI-ben oldva, és a sejtenyészeteket 5 órán keresztül továbbinkubáltuk 37 °C-on, 5% CO₂ mellett. Az inkubációt követően a tenyészeteket kétszer mostuk PBS-sel, majd metanollal fixáltuk és Giemsa szerint megfestettük (Nougayrède et al., 2006). A fixált és festett tenyészeteket fénymikroszkóppal vizsgáltuk.

3.2.6. Lpf határoló régiók monitorozása

A 6. táblázatban szereplő törzsekben az *lpf2* gén és a határoló régiók jelenlétét PCR reakciókkal monitoroztuk az 5. táblázatban felsorolt primerek felhasználásával. A primereket úgy terveztük, hogy mindegyik két szomszédos gént érintsen, ezáltal közvetve igazolva a gének sorrendjét is. A reakciók hőmérsékleti profilja a 2.2.3.2. fejezetben leírthoz hasonló volt.

3.3. Eredmények

3.3.1. Az *lpf2-1* nukleotid szekvenciájának jellegzetességei az atípusos *E. coli* O157 törzsek körében

Kozmid klónkönyvtárat alakítottunk ki az *E. coli* T22 O157:H43 törzs genomjából. Ennek felhasználásával meghatároztuk a nukleotid szekvenciáját egy 15,3 kb hosszúságú genomi szakasznak, mely az *lpf2-1* operont is tartalmazta. E régió vázlatos felépítése látható az 5. ábrán. Az annotált szekvenciát GenBank nyilvános adatbázis AHZD01000104 elérési száma alatt helyeztük el. Meghatároztuk a B47, B54, T16, T34, T49 és T50 törzsek *lpf2-1* operonjának szekvenciáját is, ezek annotált változatát rendre a KC207119, KC207120, KC207121, KC207122, KC207123 és KC207124 elérési számok alatt helyeztük el. Az operonok GC aránya 44%, szemben a határoló régiók esetében tapasztalható 52%-kal. Az általunk megszekvenált operonokban összesen négy pozícióban volt tapasztalható aminosav-szintű polimorfizmus.

Az *lpfA* gén szekvenciája az általunk meghatározott és a GenBankban elérhető *lpf2-1* operonok esetében teljesen egységes.

Az *lpfB* gén esetében az általunk megszekvenált atípusos törzsek mindegyikében a 99-es pozíció alanint kódol a többi ismert szekvenciában itt található szerin helyett.

Az *lpfC* gén az általunk vizsgált törzsekben egységesnek bizonyult a T49 jelzésű törzs kivételével, amelyben a 809-es pozíció triptofán helyett ciszteint kódol.

Az *lpfD* gén esetében a T22 törzsben a 341-es pozícióban szerin helyett alanin van, a 313-as pozícióban a T49 és a T50 törzsek a többitől eltérően metionin helyett leucint kódolnak.

6. táblázat. Az *lpf2* operon határoló régióinak elterjedtsége a 3. fejezetben vizsgált törzsekben

Törzs	Szerotípus	Filogenetikai csoport	<i>bgIG-phoU</i>	<i>phoU-phoB</i>	<i>pstB-pstA</i>	<i>pstA-pstC</i>	<i>pstC-pstS</i>	<i>pstS-lpfD</i>	<i>lpfA-glmS</i>	<i>glmS-glmU</i>	<i>glmU-atpC</i>	Hivatkozás
T16	O157:H43	B1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Tóth et al., 2009b
T22	O157:H43	B1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Tóth et al., 2009b
T34	O157:H43	B1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Tóth et al., 2009b
T49	O157:H9	B1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Tóth et al., 2009b
T50	O157:H37	B1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Tóth et al., 2009b
B47	O157:NM	B1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Tóth et al., 2009b
B54	O157:H12	A	-*	+	-*	+	+	+	+	+	+	Tóth et al., 2009b
ECOR7	O85:HN	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Ochman és Selander, 1984
ECOR23	O86:H43	A	+	+	-*	+	-	+	+	+	+	Ochman és Selander, 1984
ECOR26	O104:H21	B1	+	+	+	+	+	+	-	+	+	Ochman és Selander, 1984
ECOR30	O113:H21	B1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Ochman és Selander, 1984
ECOR32	O7:H21	B1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Ochman és Selander, 1984
ECOR33	O7:H21	B1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Ochman és Selander, 1984
ECOR34	O88:NM	B1	+	+	-	+	+	+	+	+	+	Ochman és Selander, 1984
ECOR36	O79:H25	D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Ochman és Selander, 1984
ECOR57	ON:NM	B2	-**	-**	+	+	-**	-**	-**	-**	-**	Ochman és Selander, 1984
ECOR58	O112:H8	B1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Ochman és Selander, 1984
ECOR67	O4:H43	B1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Ochman és Selander, 1984
ECOR69	ON:NM	B1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Ochman és Selander, 1984
ECOR72	O144:H8	B1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Ochman és Selander, 1984
187/06 (22)	O136:H12	B2	+	+	-*	+	+	+	+	+	+	jelen értekezés
C600	K12	A	-	+	+	+	-	+	+	+	+	Appleyard 1954

*E törzsek következetesen a vártnál hosszabb terméket adtak a jelzett reakciókban.

** E törzsek következetesen aspecifikus, vagy gyenge terméket adtak a jelzett reakciókban.

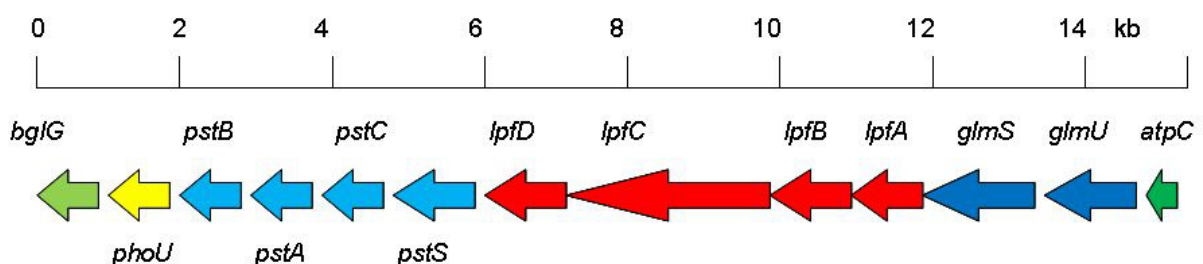
3.3.2. Az *lpf2-1* határoló régióinak jelenléte a vizsgált atípusos *E. coli* O157 és ECOR törzsek körében

Az *lpf2* operon határoló régiójában található gének monitorozása összesen 9 primerpárral történt az atípusos O157-es és az ECOR gyűjtemény *lpf* pozitív tagjai, valamint az *E. coli* K-12 C600 törzs esetében. A 21 vizsgált törzsből tizenöt, köztük egy kivétellel az atípusos O157 szerocsoportba tartozók is az összes vizsgált régióra pozitívnak bizonyultak. A határoló régiók monitorozásának eredményeit a 6. táblázat foglalja össze.

3.3.3. Az *Lpf2* expressziója és adhéziós vizsgálatok

A 48 órás tenyészetekből izolált RNS-en végzett, az *lpfA* gént célzó reverz transzkripció PCR-reakció igazolta, hogy az *lpfA* expresszálódik a T22 törzs esetében.

A szarvasmarha veséből és heréből nyert primer sejt kultúrák esetében nem volt megfigyelhető specifikus adhézió a T22 törzs esetében a kontrollként alkalmazott apatogén C600 törzsszel kezelt tenyészetekhez képest.



5. ábra. Az *E. coli* O157:H43 T22 törzs *lpf2* operonjának és határoló régióinak vázlatos felépítése a kozmid klón szekvencia-meghatározása alapján.

Az egyes funkcionális géncsoportokat eltérő színű nyilak jelzik. A *pst* géncsoport egy foszfát ABC transzportert kódol, a *phU* foszfát-transzport szabályozó fehérjét, a *bglG* transzkripció szabályozót. A *glms* géncsoport az N-acetil glükózamin-1-foszfát uridiltranszferázt, az *atpC* az ATP-szintáz C alegységét kódolja.

3.4. Megbeszélés

Összesen hét *E. coli* O157 törzs *lpf2* operonjának szekvenciáját ismertük meg. Az SNP-k (single nucleotide polymorphism; egy nukelotidot érintő polimorfizmus) alacsony száma utal egyrészt az operon konzerváltságára, másrészt arra, hogy amennyiben e törzsek HGT-vel

tettek szert ezen operonra, ez megközelítőleg egy időben történhetett, mivel a különbségek száma egymáshoz viszonyítva nagyjából azonos.

Konzervált szekvenciája mellett (7. táblázat) az *lpf2* operon genomi szigeten történő elhelyezkedését (Doughty et al., 2002) támasztja alá GC aránya is, mely egységesen 44%, szemben a határoló régiók 52%-ával, mely közel esik az *E. coli* átlagos genomi GC arányához (50,8%, Touchon et al., 2009).

A korábban jellemzett *lpf2-1*-et hordozó törzsek körében végzett PCR-vizsgálatok megerősítették a határoló régió konzervált génsorrendjét is. Az operon minden esetben, hasonlóan a korábbi irodalmi adatokhoz (Torres et al., 2002, Doughty et al., 2002), a *glmS* és *pstS* gének közt található, ami valószínűsíti, hogy ez a régió e törzsek evolúciója során integrációs „hotspot”. Toma et al. (2006) az *lpf* operonok jelenlétének vizsgálatakor külön hangsúlyt fektetett az integrációs hely érintetlenségének PCR-rel történő ellenőrzésére minden törzs esetében. Megjegyzendő továbbá, hogy az EAEC prototípusának számító, 042 jelzésű, *E. coli* O44:H18 szerotípusú törzs esetében egy Tn21 jelzésű, antibiotikum-rezisztencia géneket is hordozó transzpozon található az *lpfA* és *glmS* gének közt, vagyis további inzerció az *lpf2* operon mellett (Chaudhuri et al., 2010). További érdekesség, hogy a 6. táblázatban látható, a T22 törzs *lpf2-1* operonjával nagy hasonlóságot mutató *lpf* operonokat hordozó *E. coli* törzsek közül négy kommenzalista (7. táblázat). Az IA11 jelzésű egészséges humán eredetű izolátum a 80-as évekből (Touchon et al., 2009), az SE11 szintén egészséges humán székletből származó törzs (Oshima et al., 2008). A KO11 törzset ipari fermentációkban használják (Zhou et al., 2006), a W törzset szintén, utóbbi érdekessége, hogy a biztonságos laboratóriumi *E. coli* törzsek közül egyedülként képes a szacharózt szénforrásként hasznosítani (Archer et al., 2011).

Az RT-PCR vizsgálat megerősítette, hogy az *Lpf2* expresszáldók a T22 törzsben. Ebből az következik, hogy mivel a T22 törzs LEE-negatív, ezért az *Lpf2* expressziója más módon szabályozott, mint a LEE patogénitási szigeten kódolt Ler és H-NS fehérjék általt szabályozott *Lpf1*-é (Torres et al., 2008). Specifikus adhéziót viszont nem sikerült megfigyelni a T22 törzs és a szarvasmarha vese-, valamint here sejtenyészetek viszonylatában sem. Társszerzőink egy *lpf2*-t hordozó, LEE-negatív O136:H12 szerotípusú STEC törzssel és annak *lpf2*-hiányos mutánsával végeztek kísérleteket, melynek eredményei vonatkozó közleményünkben jelentek meg; ők nem tapasztaltak lényeges különbséget az *lpf2*-hiányos és vad típusú törzsek adhéziója közt, ezért feltételezik, hogy e törzs esetében más faktor(ok) járulhattak hozzá az adhézióhoz (Sváb et al., 2013a).

Az *lpf2-1* operon erőteljes konzerváltsága, valamint széleskörű elterjedtsége LEE-negatív törzsekben (Doughty et al., 2002, Toma et al., 2006, Torres et al., 2009) viszont mégis arra utalnak, hogy az *Lpf2* e törzsekben – ideértve az általunk vizsgált atípusos O157 törzseket is – bizonyos körülmények között valószínűleg adhéziós funkcióval bír. Továbbra sem ismert

azonban ennek mechanizmusa, ahogy az Lpf2 expressziójának szabályozása sem. Ezért feltétlenül további kísérletek lennének szükségesek az Lpf2 funkciójának meghatározásához, különösen LEE-negatív törzsek esetében. E kísérletek irányulhatnak egyrészt az Lpf2 expresszió szabályozásának felderítésére, másrészt az Lpf2 specifikus receptorának, vagy a gazda más, vele kölcsönhatásba lépő faktorainak meghatározására.

7. táblázat. *Escherichia coli* törzsek, melyeknek teljes genom szekvenciája szerepel a GenBankban, és a T22 törzsével nagy homológiát mutató *lpf2* operonnal rendelkeznek.

Az SNP-k (single nucleotide polymorphism) száma a T22 *lpf2* operonjához képest értendő. A szerotípus több helyen hiányzik, mivel a szerzők nem adták meg.

Törzs	Szerotípus	Patotípus	SNP-k száma az <i>lpf</i> operonban	GénBank elérési szám	Hivatkozás
SE11	O152:H28	kommenzalista	6	AP009240.1	Oshima et al., 2008
11128	O111:NM	EHEC	7	AP010960.1	Ogura et al., 2009
55989		EAEC	8	CU928145.2	Touchon et al., 2009
KO11		kommenzalista	9	CP002516.1	nem publikált, JGI Project ID: 4085738
W		kommenzalista	9	CP002185.1	Archer et al., 2011
11368	O26:H11	EHEC	9	AP010953.1	Ogura et al., 2009
IA11	O8	kommenzalista	10	CU928160.2	Touchon et al., 2009
E24377A		ETEC	11	CP000800.1	Rasko et al., 2008

4. A citoletális duzzasztó toxin V termelését kódoló operon (*cdt-V*) és határoló régióinak szekvencia-meghatározása, valamint monitorozása patogén és kommenzalista *E. coli* törzsekben

4.1. Bevezetés

Az *lpf* mellett célunk volt a szarvasmarha eredetű atípusos O157 törzsek másik azonosított virulenciafaktorának, a CDT-V-öt kódoló *cdt-V* operonnak, valamint környezetének pontos nukleotid-összetételét meghatározni. Az irodalmi adatok (Janka et al., 2003, Hinenoya et al., 2009, Allué-Guardia et al., 2011) szerint ugyanis a *cdt-V*-öt P2-szerű profág szekvenciák határolják, ezért meg kívántuk ismerni lehetőség szerint a teljes profág kiterjedését és szekvenciáját. Ehhez jó kiindulási alapot jelentett az *E. coli* T22 jelzésű O157:H43 törzsből már létrehozott klónkönyvtár (3. fejezet). A szekvencia-meghatározás mellett ebben az esetben is PCR-reakciókkal kívántuk monitorozni a jellegzetes határoló régiók, azaz P2-szerű fág-gének és régiók jelenlétét más CDT-V termelő, valamint egyéb CDT-típusokat termelő és CDT-negatív *E. coli* törzsek körében, ezzel célunk volt a P2-szerű profágok evolúciójának alaposabb megismerése. Amennyiben úgy találjuk, hogy a *cdt-V* operon ténylegesen egy P2-szerű profágban foglal helyet, fágindukciós kísérleteket is kívántunk végezni, felderítendő annak mobilitását és esetleges transzdukciós potenciálját, vagyis megállapítani, hogy a fág átvihető-e más baktériumtörzsekbe.

4.2. Anyagok és módszerek

4.2.1. Szekvencia-meghatározás

A szekvencia-meghatározáshoz ugyanabból a kozmid klónkönyvtárból indultunk ki, melynek készítését az *Lpf* szekvencia-meghatározásnál (3.2.2. alfejezet) már ismertettük. A *cdt-V* operont hordozó klónokat a 8. táblázatban jelzett primerekkel végzett PCR reakciók segítségével azonosítottuk. Egy, a teljes *cdt-V* operont tartalmazó klónt választottunk ki és határoztuk meg szekvenciáját a 4.1.2. alfejezetben már ismertetett módokon. Noha a kozmidon azonosítottunk számos határoló gént is, azonban a *cdt-V* operont határoló profág szekvenciák teljes megismeréséhez szükség volt a T22 törzs teljes genomjának szekvencia-meghatározásával nyert adatokra is, ennek folyamatát az 5.2 alfejezetben ismertetjük. A fenti

módszereket esetenként Sanger-féle dideoxinukleotid módszerű szekvencia-meghatározással is ki kellett egészíteni. Az ezt előkészítő PCR reakciókat minden esetben Platinum Taq HiFi polimerázzal (Sigma-Aldrich) végeztük, ezek hőprofilja hasonló volt a 2.2.3.2. fejezetben leírtakhoz, kivéve, hogy a denaturációs lépések 98 °C-on zajlottak.

4.2.2. P2-szerű profág régiók monitorozása

A 9. táblázatban felsorolt, különböző szero- és patotípusokat képviselő *E. coli* törzsekben PCR-reakciókkal ellenőriztük a T22 törzsben talált profág különböző régióinak jelenlétét. A primerek listáját az 8. táblázat tartalmazza. A primereket az NCBI honlapján elérhető PrimerBLAST eszköz segítségével terveztük úgy, hogy lehetőleg minden funkcionális géncsoportból egy génre „rákérdezzünk” a vizsgálat során.

4.2.3. Fágindukciós kísérletek

A 9. táblázatban jelzett 8 törzssel fágindukciós kísérleteket végeztünk. Propagáló törzsként a K-12 szerotípusú *E. coli* C600 és ER2738, valamint a *Shigella sonnei* 866-F jelzésű törzset használtunk, utóbbit Maite Muniesa-tól (University of Barcelona, Spanyolország) kaptuk.

A propagáló és az indukálni kívánt törzsek egy éjszakán át 200 rpm-mel LB levesben rázott tenyészeit a kísérlet napján 50-szeresre hígítottuk, majd 6 órán keresztül tovább ráztuk, és az így kapott tenyészetet használtuk fel a kísérletekben. Az indukciót háromféle módon kíséreltük meg: mitomicin-C-vel, illetve norfloxacinnal mint indukáló ágenssel, valamint UV-fényes besugárzással.

A mitomicin-C-vel, illetve norfloxacinnal indukálni kívánt törzsekhez a hígítást követően 3 órával adtuk az indukáló ágenseket rendre 0,5 µg/ml és 1,25 µg/ml koncentrációban, ezután további 3 óra rázott tenyésztés következett. A sejteket ezután 13000 g gyorsulású 1 perces centrifugálással üleptítettük, a felülúszójukat pedig 220 nm pórusméretű steril szűrőn (Merck Millipore) átszűrtük. A felülúszó és a propagáló törzs tenyészetének 1:9 arányú elegyét MgSO₄-tal és CaCl₂-dal kiegészítettük (0,0045 M végkoncentráció mindkét sóra), majd lágy LB agarral (0,5% agarózt tartalmazó LB agar táptalaj) hatszorosra hígítottuk, és LB agarlemezekre rétegeztük. Egy éjszakán át történő 37 °C-os inkubáció után figyeltük az esetlegesen megjelenő tarfoltokat.

Az UV-fényes besugárzással történő indukciót a Hertman és Luria (1967) által leírtakat részben módosítva végeztük. Az indukálni kívánt T22 törzs egyéjszakás, 200 rpm-mel LB levesben rázott tenyészetét tízszeresre hígítottuk, és további 2 órán át inkubáltuk rázás

mellett. Az ilyen módon előkészített tenyészetből 3-3 ml-t LB agarlemezekre szélesztettünk, és az így szétterített folyadéktenyészetek kapták az UV-fényes besugárzást egy 30 W teljesítményű, UV-C tartományban világító fénycsővel 15, 10 illetve 5 másodpercre megvilágítva 50 cm távolságból. A kezelt tenyészeteket új edényekbe fejtettük át az agarlemezekről, és további 2 órán át enyhe kevergetéssel 37 °C-on inkubáltuk, ezután használtuk felülúszójukat a két másik indukáló ágens esetében fent már ismertetett módon.

4.2.4. DNS izolálás fág-részecskékből és PCR

Azon esetekben, amikor izolált tarfoltok jelentek meg az indukált törzsek lágyagáros tenyészeiben, azokból több darabot steril körülmények közt kivágtunk, és mintegy tíz térfogatnyi LB táplevesben 4 órán át 200 rpm sebességgel 37 °C-on ráztuk, majd az így létrehozott dúsító tenyészeteknek az indukált tenyészetekhez hasonlóan centrifugálást követően a felülúszóját 220 nm-es szűrőn átszűrtük. Az így kezelt felülúszókat, eltávolítandó a bakteriális DNS-t, DNáz I-gyel (Amplification Grade DNase I, Sigma-Aldrich) emésztettük 20 percig, majd az enzim inaktiválása és a fág-részecskék feltárása végett 20 percig forraltuk. Az ilyen módon kezelt felülúszómintákat használtuk templátnak a *cdt-V* operon jelenlétét ellenőrző PCR-reakciókban.

8. táblázat, 1. rész. A *cdt-V*-öt a T22 törzsben hordozó P2-szerű profág génjeire specifikus primerek listája

A primereket a KC618326.1 elérési szám alatt a GenBankban elhelyezett, és általunk megszekvenált profág alapján terveztük, kivéve, ahol ezt megjegyzéssel jeleztük.

Primer név	Felerősített gén	Szekvencia 5'→3'	Pozíció
FI_fw	<i>FI</i> gén	TGCGTGTGGAAGACGGCACC	24612-24631
FI_rev		CGGCCTTGAGGGTTTCCGCAT	25413-25433
Latecontrol_D_fw	<i>D</i> gén (késői líziszabályozó)	TTCGTGGCGCTGTCCTGACG	29694-29713
Latecontrol_D_rev		TGGAGAACTCCGCAACGCCC	30448-30467
Terminase_fw	termináz	GGGAGCCGAACGGATTGGCG	10561-10580
Terminase_rev		CTTGAGCACCGCATCCGCGA	11298-11317
Capsid_fw	kapszid	CCGTCGGTCACCCAGACCCT	12975-12994
Capsid_rev		AGCGGCCAGCATTTTCGCTGT	13655-13636
Lysin_fw	lizin	ATGCTGGCCGTGTCCGAAGG	15834-15853
Lysin_rev		CTGACCGTAACCGGCACCCG	16204-16223
Tail_protein_fw	fág farok	AGGGCGCTGACTGATGCCGT	17271-17290
Tail_protein_rev		AGCTCCATCGGGCGGGTGAC	17655-17674
Baseplate_J_fw	<i>J</i> (baseplate)	GGTTGCCCGTACCCTGACGC	19335-19354
Baseplate_J_rev		GACAGACGGATGTCGCGCCC	19960-19979
L413C_specific_fw	<i>C</i>	AGGATCCAGCCCTTTCTAAA	1632-1651
L413C_specific_rev		AATCCTTTTCGCGGAGTGG	1243-1261
gpO_fw	kapszid fehérje, <i>O</i> gén	TTTCGTATCGGCGTTGAGG	11984-12002
gpO_rev		TGTTTTTCAGGCGGGTGAA	12710-12728
cpxP2_fw	<i>cpxP</i> -integráz átfedő	AGCCATATGTTTCGACGGCAT	4327924-4327943*
integrase_rev		AGGCCAGCGCCAAATTATTC	439-458
P2_cdta_up_novel_fw	"spacer" régió	CCAAGAGCACGCCAGCACTGA	8727-8747
P2_cdta_up_novel_rev		TGGCAAATCTCCTTTGGGCTAGTG	8261-8284
Cdta_up_novel_overlap_fw	<i>cdtA</i> - "spacer"	TCAATCGCGTTTTGCACTCACGG	8500-8522
Cdta_up_novel_overlap_rev		AGGTCCAGCCCCGGTAATGG	8018-8038
P2_novel_overlap_fw	Q-"spacer"	ACAAGGGAAAGCCGACGGCAT	9259-9279
P2_novel_overlap_rev		TCAGTTATCGTCAGTGCTGGCGTGC	8717-8741

* E primerek esetében a referencia az *E. coli* W jelzésű törzs CP002967 elérési szám alatt elhelyezett teljes genomja volt.

8. táblázat, 2. rész. A *cdt-V*-öt a T22 törzsben hordozó P2-szerű profág génjeire specifikus primerek listája

A primereket a KC618326.1 elérési szám alatt a GenBankban elhelyezett, és általunk megszekvenált profág alapján terveztük, kivéve, ahol ezt megjegyzéssel jeleztük.

Primer név	Felerősített gén	Szekvencia 5'→3'	Pozíció
P2_novel_overlap_fw	Q-"spacer"	ACAAGGGAAAGCCGACGGCAT	9259-9279
P2_novel_overlap_rev		TCAGTTATCGTCAGTGCTGGCGTGC	8717-8741
Cdtc_P2_overlap_fw	<i>cdtC-repA</i> átfedő	CATACCTTCAACAACAGGTGCGGT	6227-6250
Cdtc_P2_overlap_rev		TACCGGTTCCCACGCCTTCTG	5591-5611
P2_short_orfs_fw	"short orfs"	CGCCGTCAGGTTGGCGCAA	2367-2385
P2_short_orfs_rev		AACCAGCGCAGAAGCACCGC	3281-3300
ogr_fw	<i>ogr-fieF</i>	ACGTGAATTGCAGCGCCACG	30840-30859
fieF_rev		CCAGCGCCAGCAGAATTGCG	4361610-4361629*
P2_PQ_fw	Q gén P-hez közelebbi szakasza	AACACCGCAACCTGCGGCAA	9974-9993
P2_PQ_rev		CCACCAGTAAACATCCTCT	9579-9597
P2_P_fw	P gén (termináz ATPáz alegysége)	AACCTGTTTCATGTGTGAA	10676-10693
P2_P_rev		AACGAGCTGGTGATGTCGG	10191-10209
P2_repA_fw	<i>repA</i>	TTTCGATAATCTGGTTACG	4915-4933
P2_repA_rev		TATGGTCATGTTGCTGGCGC	4213-4232
P2_repA_ext_fw	<i>repA</i> távolabbi szakasz	TTGCTTCAAAGACTGACTG	3376-3394
P2_repA_ext_rev		GAAATGAACGACGTCGAACGT	2298-2318
CDT-III ^s **	<i>cdtVb</i>	GAAAGTAAATGGAATATAAATGTCCG	7291-7316
CDT-III ^{as} **		TTTGTGTCGGTGCAGCAGGAAAA	6761-6784

**A CDT-nek a kozmid klónkönyvtárban történő detektálására használt primerek, Tóth et al., 2003

4.3. Eredmények

4.3.1. A T22 törzs *cdt-V* operonjának és azt tartalmazó P2-szerű profág általános nukleinsav-szintű jellemzői

Meghatározandó a *cdt-V* operonnak és genetikai környezetének szekvenciáját az *E. coli* T22 O157:H43 törzs genomjában, a törzs genomjából készült kozmid-könyvtár *cdt-V* hordozó tagját, valamint a törzs genomjának további közeli részeit vizsgáltuk újgenerációs szekvencia-meghatározó és hagyományos, Sanger-féle dideoxinukleotid módszerekkel. Úgy találtuk, hogy a *cdt-V* operon egy 31,2 kb hosszúságú, P2-szerű profágban foglal helyet, melynek szekvenciáját a KC618326.1 elérési szám alatt helyeztük el a GenBankban. Maga a *cdt-V* operon szekvenciája a legnagyobb homológiát a GenBankban AB472840, AB472870, AB472861 és AB472839 hozzáférési számok alatt elhelyezett *cdt-V* operonokkal mutatta, melyek a Hinenoya et al. (2009) által izolált CTEC törzsekből származnak. Az aktív alegységet kódoló *cdtB* szekvenciája aminosav-szinten 100%-os egyezést mutat az AH-10 törzs *cdtB* génjének szekvenciájával (hozzáférési szám AB472840), mindössze négy szinonim nukleotid-csere a különbség a kettő között. A *cdt-V* operon GC aránya 41%, jelentős különbség a határoló P2-szerű profág 53%-ához képest. Ezen P2-szerű profág az ismert litikus P2-szerű fágok közül az L-413C-vel (hozzáférési szám AY251033) mutatja a legnagyobb hasonlóságot nukleotid-szinten (átlagosan 97% körüli szekvencia-egyezés). A profág génsorrendje, felépítése a GenBankban szereplő hasonló profágok közül az *E. coli* W és TW14359 törzsekére hasonlít leginkább, génjeinek relatív többsége a W törzs P2-szerű profágjával mutatja a legnagyobb mértékű nukleotidszintű hasonlóságot. Az annotált ORF-eket, azok pozícióit és legközelebbi homológjait a 10. táblázatban foglaltuk össze, a profág vázlatos felépítése a 6. ábrán látható.

4.3.2. A T22 törzs *cdt-V* hordozó P2-szerű profágjának további sajátosságai

Fontos újdonságot jelentett a 33-36 ORF-eket (20720-23751-es pozíció) foglaló régió. Itt a homológia-keresések alapján fág farok fiber gének találhatóak, ám ezek nem mutatnak homológiát a P2-szerű profágok hasonló funkciót betöltő génjeivel, helyette az UMNK88 jelzésű ETEC törzs (GenBank elérési szám: CP002729) egyik profágjának hasonló szakaszával mutatnak nagy nukleotid-egyezést (92-99%). A 22000-22192-es pozíció közti szakasz teljes mértékben hiányzik minden eddig meghatározott és elérhető P2-szerű fág és profág szekvenciából, az UMNK88 törzsben azonban jelen van.

9. Táblázat, 1. rész. P2-szerű fág gének jelenléte az általunk vizsgált *E. coli* törzsekben.

Törzs	Szerotípus	Patotípus	CD T- típu s	Filogenetikai csoport	"Spacer" ^{**} -Q	"Spacer" ^{**}	<i>cdtA</i> - "Spacer"	<i>cdtC</i> - <i>repA</i>	<i>P</i>	<i>P-Q</i>	<i>repA</i>	<i>repA</i> külső	<i>C</i>	<i>O</i>	"Rövid ORF- ek" ^{***}
T22*	O157:H43	<i>stx-eae-</i>	V	B1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T16*	O157:H43	<i>stx-eae-</i>	V	B1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T50*	O157:H43	<i>stx-eae-</i>	V	B1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T34*	O157:H9	<i>stx-eae-</i>	V	B1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T49*	O157:H37	<i>stx-eae-</i>	V	B1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T4	O157:H12	<i>stx-eae-</i>	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B20	O157:H12	<i>stx-eae-</i>	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B47	O157:NM	<i>stx-eae-</i>	-	B1	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
B54	O157:H12	<i>stx-eae-</i>	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E6462/68	O86:H34	EPEC	I		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BM2-10	O88	Hasmenést okozó	III		-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
28C	O75:K95	ExPEC	IV		-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+
703/88*	O157:NM	STEC	V	D	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
702/88*	O157:NM	STEC	V	D	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
493/89*	O157:NM	STEC	V	D	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
E2348/69	O127:H6	EPEC	-	B2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sakai	O157:H7	STEC	-	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C600	K12	labortörzs	-		-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
ER2738	K12	labortörzs	-		-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-

* E törzseket használtuk a fág-indukciós kísérletekben is.

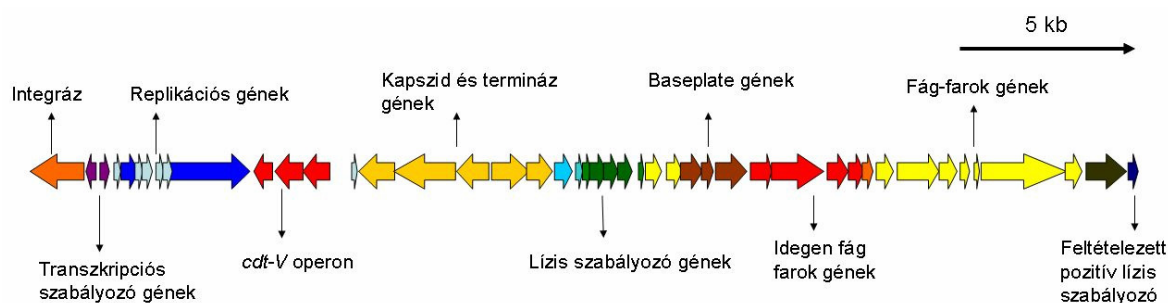
** "Spacer"-ként hivatkozunk a *cdtA* és a *Q* gén közti, ismeretlen funkciójú szakaszra.

*** "Rövid ORF-ek" néven hivatkozunk a 4 rövid ORF-ből álló szakaszra, mely a *repB*-től egy feltételezett cink-ujj motívumot tartalmazó fehérjét kódoló génig terjed.

9. Táblázat, 2. rész. P2-szerű fág gének jelenléte az általunk vizsgált *E. coli* törzsekben.

Törzs	Szerotípus	Patotípus	CDT-típus	Filogenetikai csoport	<i>J</i>	Fág farok	Termináz	<i>D</i>	<i>FI</i>	Kapszid	Lizin	<i>cpxP</i> -integráz	<i>ogr-fieF</i>	Hivatkozás
T22*	O157:H43	<i>stx-eae-</i>	V	B1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Tóth et al., 2009b
T16*	O157:H43	<i>stx-eae-</i>	V	B1	+	+	+	+	-	+	+	+	+	Tóth et al., 2009b
T50*	O157:H43	<i>stx-eae-</i>	V	B1	+	+	+	+	-	+	+	+	+	Tóth et al., 2009b
T34*	O157:H9	<i>stx-eae-</i>	V	B1	+	+	+	+	-	+	+	+	+	Tóth et al., 2009b
T49*	O157:H37	<i>stx-eae-</i>	V	B1	+	+	+	+	-	+	+	+	+	Tóth et al., 2009b
T4	O157:H12	<i>stx-eae-</i>	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Tóth et al., 2009b
B20	O157:H12	<i>stx-eae-</i>	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Tóth et al., 2009b
B47	O157:NM	<i>stx-eae-</i>	-	B1	+	+	+	+	-	-	+	+	+	Tóth et al., 2009b
B54	O157:H12	<i>stx-eae-</i>	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Tóth et al., 2009b
E6462/68	O86:H34	EPEC	I		-	-	-	-	-	-	-	-	-	Scott és Kaper, 1994
BM2-10	O88	Hasmenést okozó	III		-	+	-	-	-	-	-	-	-	De Rycke és Plassiart, 1990
28C	O75:K95	ExPEC	IV		+	+	+	+	+	-	+	-	-	Tóth et al., 2009a
703/88*	O157:NM	STEC	V	D	+	+	+	+	+	-	+	-	-	Tóth et al., 2009a
702/88*	O157:NM	STEC	V	D	+	+	+	+	+	-	+	-	-	Tóth et al., 2009a
493/89*	O157:NM	STEC	V	D	+	+	+	+	+	+	+	-	-	Karch et al., 1993
E2348/69	O127:H6	EPEC	-	B2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Iguchi et al., 2009
Sakai	O157:H7	STEC	-	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Hayashi et al., 2001a
C600	K12	labortörzs	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	Appleyard, 1954
ER2738	K12	labortörzs	-		-	-	-	+	-	-	-	-	-	Woodcock et al., 1989

* E törzseket használtuk a fág-indukciós kísérletekben is.



6. ábra. Az *E. coli* O157:H43 T22 törzs P2-szerű profágjának vázlatos felépítése.

4.3.3. P2-szerű profág gének elterjedtsége patogén és kommenzalista *E. coli* törzsek körében

Összesen 20 jellegzetes P2-szerű génszakasz jelenlétét vizsgáltuk PCR reakciók segítségével, a T22 törzs P2-szerű profágjának szekvenciája alapján tervezett primerek felhasználásával, CDT-V-termelő, egyéb CDT-típusokat termelő és CDT-negatív törzsek körében (n=21), e vizsgálatok eredményeit a 9. táblázat foglalja össze. A CDT-V-termelő törzsek a vizsgált szakaszok többségét hordozták. A Q kapszid-gén és a *cdtA* gén közti spacer régióból induló, és a Q génben végződő szakaszt csak az O157:H43 szerotípusú törzsekből tudtuk kieroősíteni, a farok hüvely monomert (*Fl* gén) pedig csak a T22 törzsből és a három CDT-V-pozitív STEC törzsből. Utóbbi törzsekből azonban nem tudtuk kieroősíteni a C gént, a 702/88 és 703/88 jelzésűekből pedig a nagy kapszid fehérje génre specifikus szakaszt sem. Az egyéb CDT-típust termelő, valamint a CDT-negatív törzsek legfeljebb két szakaszra voltak pozitívak, kivéve a B47-es jelzésű, atípusos O157:NM törzset és a CDT-IV-termelő 28C jelzésű törzset; előbbi tizenöt, utóbbi tizenkét szakaszra pozitívnak bizonyult. A Q gén egyik szakaszára specifikus PQ primerpárral (8. táblázat) kapott PCR-termékek szekvencia-meghatározása kimutatta, hogy a 376 bázis hosszúságú szakaszon a pozitív törzsek összesen tizennégy pozícióban mutattak polimorfizmust, melyek közül csak három okozott aminosav-cserét a T22 törzs megfelelő szakaszához képest.

4.3.4. Fágindukciós kísérletek eredményei

Megvizsgálandó a CDT-V pozitív törzseink által esetlegesen hordozott litikus fágokat, fágindukciós kísérleteket is végeztünk az említett törzsekkel. Indukáló ágensként mitomicin-C-t, norfloxacin-t, és UV-fényt használtunk, utóbbi csak a T22 törzs esetében. A 702/88 és a 493/89 jelzésű, O157:NM EHEC törzsekből mitomicin-C hatására fág-részecskék szabadultak fel, melyeket a C600 jelzésű K-12 törzsen szaporítani is tudtunk. PCR reakciókkal

megvizsgálva azonban e fágok *cdt-V* negatívnak bizonyultak. A többi esetben litikus fágokat nem sikerült detektálnunk.

4.4. Megbeszélés

4.4.1. A *cdt-V* operon a T22 törzsben

Munkánk során elsőként határoztuk meg egy teljes, *cdt-V* operont hordozó P2-szerű profág genom szekvenciáját a T22 jelzésű O157:H43 szerotípusú *E. coli* törzs genomjából. Magának a *cdt-V* operonnak a szekvenciája a legnagyobb hasonlóságot a GenBankban elérhető szekvenciák közül az AH-10 törzs *cdt-V* operonjával mutatja (Hinenoya et al., 2009). Eredményeink bővítik a korábbi ismereteket, melyek szerint egyrészt ezt az operont P2-szerű profág-szekvenciák határolják (Janka et al., 2003; Hinenoya et al., 2009). Beszámoltak továbbá a *cdt-V* operont hordozó, indukálható P2-szerű fágokról is (Allué-Guardia et al., 2011). Az operont közvetlenül határoló régiók szekvenciája a T22 törzs esetében igen nagy hasonlóságot mutat az idézett szerzők által publikált szekvenciákhoz, ám az ő esetükben a szekvencia-meghatározás néhány száz bázispárnál nem nagyobb szakaszokra korlátozódott (Janka et al., 2003; Hinenoya et al., 2009; Allué-Guardia et al., 2011).

4.4.2. A *cdt-V* hordozó P2-szerű profág általános jellemzői

Az ismert genom szekvenciájú litikus P2-szerű profágok közül a T22 törzs profágja az L-413C fággal mutatja a legnagyobb hasonlóságot, melyet először *Yersinia pestis*ből indukáltak (Larina et al., 1970, Garcia et al., 2008). Az egyes gének nukleotid szekvenciáját a GenBankban rendelkezésre álló szekvenciákhoz hasonlítva azok különböző *E. coli* törzsek P2-szerű profágjainak génjeivel mutatnak 94-100% közti homológiát (10. táblázat). PCR-reakciók, valamint a T22 törzs teljes genom meghatározási projektje (5. fejezet) megerősítette, hogy a profág integrációs helye a *cpxP* és a *fieF* háztartási gének között van, a GenBankban négy másik törzs esetében található még ezen a helyen P2-szerű profág (GenBank elérési számok: CP002967.1, CP002797.2, CP001969.1, és CP000970.1). A *cpxP* gén a P-pilus represszorát, míg a *fieF* gén egy vastranszport fehérjét kódol.

10. Táblázat, 1. rész. Az *E. coli* O157:H43 T22 törzs P2-szerű profágjának ORF-ei

Az „Egyező nukleotidok száma” oszlopban a 100%-os egyezést vastagon szedett betűk jelzik.

ORF	Termék, jellegzetes motívum	Start pozíció	Vég pozíció	Méret (nukleotid)	Egyező nukleotidok száma / egyezés %	Referencia hozzáférési száma	Referencia törzs
1	integráz	187	1167	981	980/981, 99%	CP002797.2	NA114
2	immunitás represszor	1237	1530	294	294/294, 100%	AY251033.1	L-413C bakteriofág
3	represszor, profág-kivágódás	1667	1939	273	273/273, 100%	CP002797.2	NA114
4	ismeretlen	1915	2112	198	196/198, 99%	CP002797.2	NA114
5	DNS replikációs fehérje	2109	2609	501	501/501, 100%	CP001368.2	TW14359
6	ismeretlen	2673	2897	225	223/225, 100%	CP000800.1	E24377A
7	ismeretlen	2897	3199	303	290/303, 96%	CP002967.1	W
8	feltételezett cink-ujj fehérje	3199	3423	225	221/225, 98%	CP002185	W
9	ismeretlen	3420	3695	276	274/276, 99%	CP002967.1	W
10	DNS replikáció	3685	5982	2298	2191/2262, 97%	CP002185	W
11	citotétális duzzasztó toxin C alegység	6058	6603	546	545/546, 99%	AB472839	AH-10
12	citotétális duzzasztó toxin B alegység	6618	7427	810	809/810, 99%	AB472860	AH-16
13	citotétális duzzasztó toxin A alegység	7424	8200	777	777/777, 100%	JF461073	fi125 bakteriofág
14	feltételezett fehérje	8779	8940	162	161/162, 99%	AB472870	AH-26
15	fág kapszid fehérje	8979	10013	1035	1009/1035, 97%	CP000970	SMS-3-5
16	fág termináz, ATPáz alegység	10014	11786	1773	1724/1774, 97%	AY251033.1	L-413C bakteriofág
17	fág kapszid fehérje	11894	12814	921	896/921, 97%	CP002185	W
18	fág nagyobb kapszid fehérje	12873	13946	1074	1060/1074, 97%	CP002185	W
19	fág termináz, endonukleáz alegység	13951	14693	744	727/744, 98%	AJ298566.1	299 bakteriofág
20	fág fej stabilizáló fehérje	14793	15302	510	499/510, 98%	CP000970	SMS-3-5
21	fág farok stabilizáló fehérje	15302	15505	204	202/204, 99%	AY251033.1	L-413C bakteriofág
22	fág holin	15544	15789	246	246/246, 100%	AY251033.1	L-413C bakteriofág
23	fág lizin	15789	16286	498	492/498, 99%	CP002967.1	W

10. Táblázat, 2. rész. Az *E. coli* O157:H43 T22 törzs P2-szerű profágjának ORF-ei

ORF	Termék, jellegzetes motívum	Start pozíció	Vég pozíció	Méret (nukleotid)	Egyező nukleotidok száma / egyezés %	Referencia elérési száma	Referencia törzs
24	fág holin, endolizin	16301	16726	414	420/426, 99%	CU928161	S88
25	fág "spanin"	16714	17139	426	412/426, 97%	CP000970	SMS-3-5
26	fág külső membrán lipoprotein	17126	17284	159	157/159, 99%	CP002967.1	W
27	fág farok fehérje	17247	17714	468	461/468, 99%	CP002967.1	W
28	fág farok fehérje	17707	18159	453	441/453, 97%	CP002967	W
29	alaplemez összeállító fehérje	18226	18861	636	622/636, 98%	CP002967.1	W
30	alaplemez összeállító fehérje	18858	19205	348	342/348, 98%	CU928162	ED1a
31	alaplemez összeállító fehérje	19210	20118	909	890/909, 98%	CP001969	IHE3034
32	fág farok fiber	20111	20722	612	603/612, 99%	CP001368	TW14359
33	fág farok fiber	20719	22218	1500	1437/1502, 96%	CP002729	UMNK88
34	fág farok fiber összeállító fehérje	22218	22820	603	595/603, 99%	CP002729	UMNK88
35	fág farok fiber összeállító fehérje	22792	23235	444	433/444, 98%	CP001368	TW14359
36	feltételezett fehérje	23256	23570	315	289/315, 92%	CP002729	UMNK88
37	fág DNS invertáz	23713	24207	495	468/499, 94%	CP002967	W
38	fág farok hüvely fehérje	24362	25552	1191	1173/1191, 98%	HE616528	<i>Shigella sonnei</i> 53G
39	fág farok cső fehérje	25565	26083	519	518/519, 99%	CU928161	S88
40	fág farok fehérje	26140	26415	276	267/276, 97%	CP002516	KO11
41	feltételezett fág farok fehérje	26412	26567	156	156/156, 100%	CP004009	APEC O78
42	fág fehérje	26560	29007	2448	2390/2448, 98%	CU928162	ED1a
43	fág farok fehérje	29022	29501	480	471/480, 98%	CP002967	W
44	<i>D</i> gén	29501	30664	1164	1137/1164, 98%	CU928161	S88
45	feltételezett pozitív lízisszabályozó	30671	30964	294	288/294, 98%	CP000970	SMS-3-5

4.4.3. Idegen gének integrációs helyei a P2-szerű profágban

A *cdt-V* operon integrációs helye a profágon belül a TO régió. E szakasz a litikus P2-szerű fágokban az itt található *tin* és *old* fág-immunitási génekről kapta a nevét, Nilsson és Håggard-Ljungquist (2007) szerint pedig profágok esetében a gazda számára potenciálisan előnyös géneket hordozhat. A *cdt-V*, mint fontos virulencia-gén alátámasztja ezt a felvetést, ám megjegyzendő, hogy eddig a CDT-V az egyetlen igazolt virulenciafaktor, mely a P2-szerű fágok ezen régiójában kódolt. A GenBank adatbázisban elérhető P2-szerű profág szekvenciák közül a legtöbbször az esetében a TO régióban egy „hipotetikus fehérje”, azaz ismeretlen funkciójú fehérje-kódoló gén található. Egyedül a TW14359 törzs esetében találunk itt „feltételezett virulenciafaktor”, mely részleges homológiát mutat egy eukarióta szerin-észterázzal, valamint a *Bacillus amyloliquefaciens* egyik ismeretlen funkciójú génjével (Kulasekara et al., 2009). Odegrip et al. (2006) az ECOR törzsekben található P2-szerű profágokat vizsgálva azt találták, hogy több törzs profágja reverz transzkriptáz gént hordoz a TO régióban. A *cdt-V* operonnak a profághoz képest idegen eredetét támasztja alá a szekvenciájuk GC aránya közti különbség is: míg a profágé 53%, a *cdt-V* operoné 41%.

A TO régió mellett még a Z/fun régiót, tekintik olyan szakasznak, mely a P2-szerű profágokban jellemzően idegen gének integrációs helyéül szolgál (Nilsson és Håggard-Ljungquist, 2007) a *G* farok fiber gén és az *FI* farokburok gén között. A régió a nevét a TO régióhoz hasonlóan a litikus P2-fágban itt található génekről kapta. A T22 törzs profágja esetében a megfelelő régióban, az 33.-tól a 36. ORF-ig terjedő, azaz a 20720-23571 pozíciók közti szakasz nem mutat hasonlóságot P2-szerű fág szekvenciákkal, ellenben az UMNK88 jelzésű, O149 szerocsoportba tartozó ETEC törzs teljes genomjában (Shepard et al., 2012) található profág farok fiber génjeivel igen. Ezen kívül a T22 törzs profágja *G* gént sem tartalmaz, a fenti szakasz a 32. ORF, azaz a *H* gén (a *G*-től közvetlenül upstream következő) és a 37. ORF, vagyis az *FI* gén közt található. Nilsson et al. (2004) szerint a Z/fun régióba helyspecifikus rekombinációval épülhetnek be idegen eredetű gének. Az *E. coli* O157 törzsek esetében már beszámoltak profágok egymás közti rekombinációjáról (Asadulghani et al., 2009), a profág genomok mozaikos felépítése pedig Asakura et al. (2007) szerint a különböző bakteriofágok és gazdáik közti kiterjedt géncserék következménye, mint például a *cdt-I*-et és *cdt-IV*-et hordozó lambdoid profágok esetében (Asakura et al., 2007, Tóth et al., 2009a). Valószínű tehát, hogy a T22 profágjának Z/fun régiójában is hasonló géncserék mentek végbe.

4.4.4. P2-szerű fág gének különböző patotípusú *cdt-V* pozitív törzsekben

Az a tény, hogy sem mitomicin C-vel vagy norfloxaccinnal, sem UV fénnel nem tudunk fágokat indukálni a *cdt-V* pozitív törzsekből, megfelel a jelenlegi tudásnak, mely szerint a P2-fágok *E. coli*-ban általában nem indukálhatók (Nilsson és Håggard-Ljungquist, 2007). Ebből az is következik, hogy az STEC törzsekben talált indukálható *cdt-V* hordozó P2-szerű fágok (Allué-Guardia et al., 2011) valószínűleg korábbi evolúciós állapotot képviselnek, valamint, hogy az általunk vizsgált profágok már feltehetőleg a gazdához való adaptációjuk következtében temperálódtak. Nem zárható ki azonban az sem, hogy összhangban az *E. coli* fágok körében tapasztalható gyakori rekombinációval (Asadulghani et al., 2009), egy másik fágból származó gének segítségével váltak litikussá.

P2-profág szekvenciák jellemezték az összes *cdt-V* pozitív törzset, a PCR-vizsgálatok által feltárt különbségeket valószínűleg a különböző gazdákhöz történt adaptáció okozza. E különbségek közül kiemelendő a regulátor szerepű *C* gén (ORF2), mely az általunk tervezett primerekkel vizsgálva csak az atípusos O157 törzseket jellemezte, míg az EHEC törzsekben nem találtuk meg (8. táblázat). A jelenség oka lehet a *C* gén nagyfokú variabilitása, melynek okán Nilsson és Håggard-Ljungquist (2007), valamint Nilsson et al. (2011) e gén filogenetikai markerként való használatát javasolják. Lehetséges tehát, hogy szemben a T22 törzs, és valószínűleg a többi atípusos törzs által is hordozott, az L-413C fágéhoz hasonló *C* génnel, az EHEC törzsek profágjai más típusú *C* génnel rendelkeznek. Ez utóbbi feltevés, valamint az a tény, hogy a profág integrációs helyére specifikus PCR-ben is negatívnak bizonyultak, arra utal, hogy az EHEC törzsek *cdt-V* hordozó P2-szerű profágjai más evolúciós utat képviselnek, mint az atípusos törzsekben található.

Összességében eredményeink és a korábbi irodalmi adatok arra mutatnak, hogy a *cdt-V* hordozó P2-szerű profágok közt legalább három leszármazási vonal figyelhető meg, az egyik az atípusos O157-es törzsekben, egy másik az EHEC O157:NM törzsekben, harmadiknak pedig az Allué-Guardia et al. (2011) által különböző szerotípusú EHEC törzsekben talált litikus fágok tekinthetők. Izgalmas további kutatási cél lehetne annak meghatározása, hogy az egyes P2-szerű profág variánsok eloszlása jellemző bélyege-e az egyes *E. coli* klonális csoportoknak.

4.4.5. P2-szerű gének CDT-V-öt nem termelő *E. coli* törzsekben

További érdekes eredmény, hogy a 28C jelzésű, ExPEC patotípusú, CDT-IV termelő (Tóth et al., 2009a) törzsben a P2-szerű gének többségét megtaláltuk, noha ezek nem az a törzs által hordozott *cdt-IV* operon környezetében található. Szintén sok P2-szerű gént hordozott a *cdt*-negatív, B47 jelzésű, O157:NM szerotípusú, atípusos törzs. A PCR-

vizsgálatok sem a *cdt-V* operont, sem a közvetlenül azt határoló régiókat nem mutatták ki, viszont a többi P2-szerű gént igen, és az integrációs helyekre specifikus PCR-ek is pozitívnak bizonyultak e törzs esetében. Mindez arra utal, hogy a B47 törzs is egy P2-szerű profágot hordozhat, mely ugyanúgy a *cpxP* és *fieF* gének közé integrálódott, mint a T22 törzs genomjában. Jelen pillanatban viszont nem lehet megmondani, hogy e feltételezett profág TO vagy Z/fun régióiban van-e inzerció, és ha igen, milyen jellegű gént vagy géneket hordoz.

Fontosnak tartjuk azt is, hogy az általunk vizsgált, és vélhetően csaknem teljes P2-szerű profágot hordozó atípusos O157 törzsek filogenetikailag is elkülönültek az ilyen géneket nem hordozóktól; míg az előbbieket (B47, T16, T22, T34, T49, T50) a B1 csoportba tartoznak, addig az utóbbiak (B20, B54, T4) az A csoportba (és valamennyien az O157:H12 szerotípusba) tartoznak (9. táblázat).

4.4.6. Végső következtetések

Janka et al. (2003) szerint az O157:NM EHEC törzsek valószínűleg egyszerre vették fel a *cdt-V* operont hordozó P2-szerű profágot. Habár ezen törzsek többsége valóban *cdt-V* pozitív (Osek, 2005, Friedrich et al., 2006, Orth et al., 2006), számos más szero- és patotípusba tartozó törzs, részben egészséges szarvasmarhából (Orth et al., 2006, Tóth et al., 2009b), részben humán hasmenéses esetekből származók (Bielaszewska et al., 2004, Bielaszewska et al., 2009, Hinenoya et al., 2009) is hordozza a *cdt-V* operont. Az idézett munkák, valamint vizsgálataink eredményei azt jelzik, hogy míg a *cdt-V* gének inkább konzerváltak, addig az őket hordozó P2-szerű profágok szekvenciájában változatosság tapasztalható, a változások pedig a legtöbb esetben a fágok mobilitásának elvesztéséhez vezethettek (Nilsson et al., 2011). Mindez arra mutat, hogy a *cdt-V* operont hordozó P2-szerű profágok evolúciós története összetettebb lehet, valamint hogy a törzsekre úgy hatott a szelekciós nyomás, hogy egyrészt működőképese állapotban megőrizték a *cdt-V* operont, másrészt stabilizálják azt, vagyis a hordozó bakteriofágot inaktíválják. A CDT-V termelő törzsek P2-profágjainak kiterjedtebb vizsgálata segítene abban, hogy tisztázzuk ezen profágok *E. coli* törzsek közti eloszlásának evolúciós hátterét.

5. Az *Escherichia coli* T22 O157:H43 törzs draft genom szekvenciája

5.1 Bevezetés

Az EHEC O157:H7 és O157:NM törzsek közül, mint ahogy már az irodalmi áttekintésben is említettük, többnek ismerjük a teljes genom szekvenciáját. Az értekezésünk ezen fejezetének alapjául szolgáló közlemény írása idején e szerotípusba tartozó törzsek a GenBankban öt véglegesen lezárt és annotált (Hayashi et al., 2001a; Perna et al., 2001; Kulasekara et al., 2009), 30 draft szintig meghatározott és egy töredékes genommal képviselték magukat. A szerocsoport egyéb H antigénnel rendelkező szerotípusaiba tartozó törzsekről a fentiekhez képest igen kevés szekvenciaadat áll rendelkezésre. Ennek fényében célunk volt, hogy az általunk vizsgált szarvasmarha eredetű, és atípusos virulencia génkészlettel rendelkező O157 törzsek közül egynek meghatározzuk a draft genom szekvenciáját.

Modelltörzsünk az értekezésben előzőleg ismertetett, az *lpf* és *cdt-V* operonok genetikai hátterének megismerését célzó kísérletek kulcstörzse, az *E. coli* T22 jelzésű O157:H43 szerotípusú törzs volt.

5.2. Anyagok és módszerek

5.2.1. DNS-izolálás

A T22 törzs kromoszomális DNS-ét GenElute Bacterial Genomic DNA Kittel (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) izoláltuk a gyártó utasításai szerint. Plazmid DNS-t a Birnboim és Doly (1979) által közölt alkalikus lízis módszert követve izoláltunk a törzsből. A DNS koncentrációját NanoDrop 2000 készülékkel (ThermoScientific, Wilmington, USA) ellenőriztük.

5.2.2. Szekvencia-meghatározás

A kromoszomális és plazmid DNS szekvenciáját három újgenerációs szekvenálási platform használatának kombinációjával határoztuk meg (BayGen Intézet, Szeged), ezek a SOLiD 4, Ion Torrent PGM és a 454 Titanium voltak. A SOLiD 4 szekvenálás előkészítése „mate-paired” módon történt, összesen 6.944.992 darab 50+50 bázis hosszúságú leolvasás

készült ezen a platformon. Ezt kombináltuk az Ion Torrenten készült 233.333, átlagosan 161,1 bázis hosszúságú leolvasással, valamint a 454 Titanium 73.764, átlagosan 619 bázis hosszúságú leolvasásával.

A szekvenciák összeállítása a CLC Genomic Workbench 6.0 program segítségével történt (Csuros et al., 2010). Az annotációt az NCBI honlapján elérhető Prokaryotic Genome Automatic Annotation Pipeline programcsomaggal végeztük, mely a GeneMark, Glimmer és tRNAscan-SE keresőprogramokat alkalmazza.

5.2.3. Szekvenciaadatok elemzése

Multi-lókuszos szekvencia tipizálást (Multi-locus Sequence Typing, MLST) is végeztünk a szekvenciaadatok felhasználásával az írországi University College Cork Environmental Institute (UCC) által fenntartott adatbázis (Wirth et al., 2006) segítségével. Ez a következő hét háztartási gén szekvenciáján alapul:

- *adk*: adenilát kináz
- *fumC*: fumarinsav hidratáz
- *gyrB*: DNS giráz B alegység
- *icd*: izocitromsav dehidrogenáz
- *mdh*: almasav dehidrogenáz
- *purA*: adeniloszukcinát dehidrogenáz
- *recA*: rekombináz, ATP/GTP kötő motívum

E gének különböző változatainak nukleotid-szekvenciáját az adatbázis szervere BLAST algoritmus segítségével hasonlítja össze a felhasználó által megadott szekvenciákkal, és a hasonlóság alapján sorolja be azokat a megfelelő szekvenciatípusba.

Az O antigén bioszintéziséért felelős géncsoport tagjai közül a *wzxC* gén (mely egy kolánsav-transzportert kódol) szekvenciáját az és a CLC Genomic Workbench 6.0 program UPGMA (Unweighted Paired Group Method of Arithmetic means) algoritmusának segítségével összehasonlítottuk az Iguchi et al. (2011) munkájában szereplő több másik O157 törzs, valamint a DH10B jelzésű K12 törzs megfelelő génjének szekvenciájával, az eredményt törzsfán ábráztuk ugyancsak a CLC Genomic Workbench 6.0 segítségével (7. ábra).

5.3. Eredmények

5.3.1. Az *E. coli* T22 O157:H43 törzs genomjának mérete és jellemzői

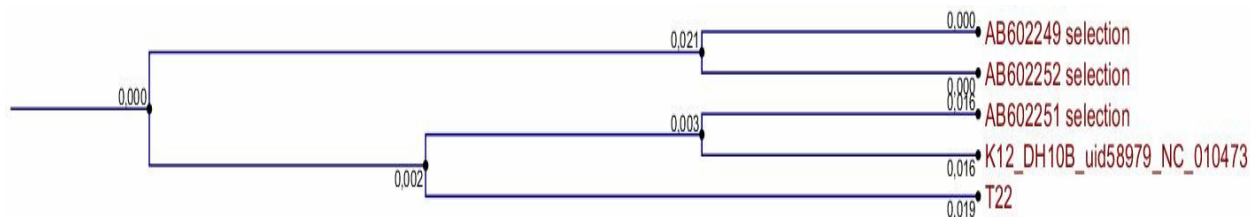
Az *E. coli* T22 O157:H43 törzs draft genom szekvenciájának összesített mérete 5.039.647 bp. Ezen belül a kromoszomális DNS összesített hossza 4.959.535 bp, a törzs által hordozott plazmidé pedig 80.112 bp. A kromoszómát 61 kontigba sikerült összeállítani, és összesen 5587 prediktált gént, azaz nyílt leolvasási keretet (ORF) tartalmaz. Ezek közül 5511 fehérjét, 17 rRNS-t, és 59 tRNS-t kódol. A plazmid szekvencia jelenlegi állapotában három kontigból áll, összesen 90 gént tartalmaz, ebből 89 fehérjét kódol, egy tRNS-t. A genom GC aránya 50,8%. A draft genom szekvenciát a GenBank AHZD00000000.2 elérési száma alatt helyeztük el.

5.3.2. Virulenciagének integrációs helyei

A T22 törzs a szekvenciadatok alapján valóban nem hordozza sem az EHEC (*stx*, *eae*), sem az EPEC (*eae*, *bfp*), sem az ETEC (*st*, *lt*), sem az EAEC (*aggR*) kulcs virulenciagénjeit sem a kromoszómán, sem a plazmidon, utóbbi nem hordozta pO157-re jellemző *ehx* gént sem. E géneket, az általuk kódolt virulenciafaktorokat és integrációs helyeiket foglalja össze a 11. táblázat.

5.3.3. Filogenetikai jellemzők

A hét háztartási gén szekvenciáján alapuló MLST tipizálás azt mutatta, hogy a T22 törzs a 155-ös szekvenciatípusba, vagyis az ST155-be tartozik. Az O157 antigén cluster részét képező *wzx*C gén szekvenciája a T22 törzs esetében egy nukleotid híján 100%-os egyezést mutat a PV-0024 jelzésű, szintén O157:H43 szerotípusú törzsével, melynek O antigén clustere a GenBankban az AB602253.1 elérési szám alatt található



7. ábra. A T22 és további három *E. coli* O157, valamint a DH10B jelzésű *E. coli* K12 törzs *wzxC* génje alapján UPGMA módszerrel készült törzsfá.

A *wzxC* az O antigén bioszintézis géncsoportjába tartozik. Az AB602249, AB602251 és AB602252 elérési számú szekvenciákat Iguchi et al. (2011) határozták meg, és rendre az alábbi *E. coli* törzsekből származnak:

AB602249: EC95-42 jelzés, O157:H45 szerotípus

AB602251: PV01-185 jelzés, O157:H16 szerotípus

AB602252: PV57 jelzés, O157:H39 szerotípus

Az elágazásoknál szereplő számok a szekvenciák közti távolságot, azaz különbözőségük mértékét mutatják (0 = 100% egyezés, 1 = 0% egyezés).

5.4. Megbeszélés

Elsőként határoztuk meg egy O157:H43 szerotípusba tartozó *E. coli* törzs teljes genomjának szekvenciáját. Az adatok azt mutatják, hogy valóban egy új genotípust képviselő, patotípusát tekintve pedig atípusosnak mondható törzsről van szó, hiszen egyetlen definiált patotípus kulcs-virulenciafaktorait sem tartalmazza. Az MLST elemzésnek mára több válfaját is kidolgozták *E. coli*-ra, mi az egyik legkorábban kidolgozott és legszélesebb körben elterjedt módszert alkalmaztuk, mely hét háztartási gén szekvenciáján alapul (Wirth et al., 2006). Az UCC-nek az 5.2 alfejezetben hivatkozott adatbázisa szerint az ST155, melybe a T22 az MLST analízis alapján tartozik, a kommenzalisták mellett számos állati és emberi patogén, változatos szerotípusokat képviselő *E. coli* törzset tartalmaz. A szekvenciaadatok azt mutatják, hogy számos patotípus kulcs virulenciafaktorainak (Perna et al., 2001, Ohnishi et al., 2002, Recktenwald és Schmidt, 2002), valamint a LEE patogenitási szigetnek az integrációs helyei (Bertin et al., 2004) épek a T22 törzs genomjában (11. táblázat), ezért lehetséges, hogy a törzs egy közbülső evolúciós állapotot képvisel az EHEC kialakulásában, és alkalmas lehet ezen gén felvételére. A *wzxC* gén szekvenciája alapján végzett UPGMA vizsgálat azt mutatja, hogy az *rfbE* génhez képest (Iguchi et al., 2011) a *wzxC* gén alapján a különböző H antigénnel rendelkező *E. coli* törzsek némileg másképp csoportosulnak. Míg az *rfbE* szerinti csoportosításban az intimin-negatív O157:H16 törzsek az ott szereplő O157:H43 törzs legközelebbi rokonai, a *wzxC* esetében az intimin-pozitív

O157:H16-os törzs szekvenciája esett a legközelebb a T22 törzséhez (7. ábra). Az idézett munkában szereplő O157:H43-as törzs *wzxC* szekvenciájával való szoros rokonság azonban megfelel a szerotípus-beli egyezésnek. Megjegyzendő, hogy az említett, P-0024 jelzésű, törzset a szerzők a T22-höz hasonlóan nem tudták egyik ismert patotípusba sem besorolni (Iguchi et al., 2011).

Első leírásakor a T22 törzsről, csakúgy, mint a többi atípusos O157 törzsről megállapították, hogy nem bontják a szorbitot (Tóth et al., 2009b), ez az O157 szerocsoport Feng et al. (2007) által publikált evolúciós modellje szerint fontos bélyegnek számít, valamint a fent említett P-0024 törzshöz képest eltérésnek, mivel ez utóbbi szorbitbontó. Feng et al. (2007) modellje szerint az O157:H7 törzsek közül a szorbitbontók számítanak ősi bnek, tőlük származnak a szintén szorbitbontó O157:NM EHEC törzsek, valamint az e tulajdonságukat már elvesztett, a szorbitot nem bontó O157:H7 törzsek. Az általunk vizsgált atípusos O157 törzsek, ideértve a T22-t is, e modell szerint keletkeztek a szorbitbontás elvesztése után bekövetkezett szerotípusváltással, és kulcs-virulenciagének elvesztésével.

11. táblázat. Az *E. coli* T22 O157:H43 törzs genomjában vizsgált jellegzetes integrációs helyek és gének

Gén	Funkció	Patotípus	Integrációs hely	Integrációs hely génfunkciója	Hivatkozás
<i>stx1</i> , <i>stx2</i>	Shiga-toxin	EHEC	<i>wrbA</i>	transzkripció szabályozó	Perna et al., 2001; Ohnishi et al., 2002; Recktenwald és Schmidt, 2002
			<i>yecE</i>	ismeretlen	
			<i>sbcB</i>	exonukleáz	
LEE PAI	intimin, T3SS és egyéb	EPEC, EHEC	<i>selC</i>	tRNS	Bertin et al., 2004
			<i>pheU</i>	tRNS	
			<i>pheV</i>	tRNS	
HPI	főként vas-kelátorok	EPEC	<i>asnT</i>	tRNS	
<i>gud</i>	béta-glükuronidáz	EHEC evolúciós bélyeg	-	-	
<i>astA</i>	EAST1 hőstabil enterotoxin	EAEC	pAA plazmid		
<i>aggR</i>	aggregatív adhéziós fimbria I	EAEC	pAA plazmid		

6. Záró megbeszélés

Vizsgálataink alapvető célja volt az egészséges szarvasmarhából származó, atípusos virulencia génkészlettel rendelkező O157 szerocsoportú *E. coli* törzsek genetikai vizsgálata, különös tekintettel az Lpf2 és a CDT-V virulenciafaktorokra.

Ennek keretében egyik célunk volt az Lpf 2-es típusának genetikájáról és elterjedtségéről információkat nyerni atípusos, valamint EHEC és EPEC O157 szerocsoportbeli törzsek körében. Két tényező teszi ezt a virulenciafaktort érdekessé: egyrészt korábbi irodalmi adatok szerint ezen Lpf-típus igen elterjedt sok különböző szero- és patotípust képviselő patogén *E. coli* törzs körében (Toma et al., 2006, Torres et al., 2009), másrészt valószínűleg adhéziós funkcióval bír (Jordan et al., 2004). Utóbbi különösen fontossá teheti olyan törzsek esetében, melyeknek más adhezinjéről nem tudunk.

Az általunk vizsgált *E. coli* O157 szerocsoportba tartozó törzsek filogenetikai tipizálása és *lpf* operonjaik genotipizálása egyértelműen megmutatta, hogy e törzsekben belül létezik egy vagy több, atípusos virulenciafaktor készlettel rendelkező leszármazási vonal, mely elkülönül ugyanezen szerocsoport EHEC és EPEC törzseitől. A Torres et al. (2009) által publikált tipizáló séma alkalmazása megerősítette, hogy összefüggés van a törzsek patotípusa és az általuk hordozott *lpf* allélikus típus(ok) között. Az atípusos törzsek csak egyet, az *lpf2-1* típust hordozták, szemben az EHEC és EPEC törzsek két *lpf* operonjával, melyek minden esetben az *lpf1-3* és *lpf2-2* típust képviselték (Sváb és Tóth, 2012).

Az *lpf2-1* operon szekvencia-meghatározása megmutatta, hogy ezen operon szekvenciája igen konzervatív az atípusos O157 törzsek körében, és egy hasonlóan konzervatív felépítésű genomi régióban alkot egy PAI-t, mindezek pedig szekvencia-szinten igen hasonlóak számos, különböző patotípusú törzsben található *lpf2* operonhoz és azok genetikai környezetéhez. Ezen eredmények arra mutatnak, hogy az *lpf* operonok nagy valószínűséggel HGT révén terjedtek el a különböző patogén *E. coli* törzsek között (Sváb et al., 2013a).

Korábban már több munka is kimutatta, hogy az *stx*-negatív, „atípusos EPEC” törzsek szerepet játszanak hasmenéses és HUS esetekben (Friedrich et al., 2007, Bielaszewska et al., 2008). Mivel a fertőzés folyamatában a gazda nyálkahártyáján való megtapadás kulcsfontosságú, és az általunk vizsgált törzsekből a LEE hiányzik, ezért jó okunk van feltételezni, hogy az esetükben az Lpf2 töltheti be valamilyen módon ezt a szerepet. E

felvetést részben alátámasztják azon kísérletek eredményei, melyeket kettős Lpf-mutánsokkal végeztek (Jordan et al., 2004, Lloyd et al., 2012). Az általunk végzett ilyen irányú kísérletek nem vezettek eredményre, azonban megjegyzendő, hogy míg az Lpf1 esetében immár ismerjük annak expressziós szabályozását is (Torres et al., 2007), valamint a vele kölcsönhatásba lépő fehérjék körét (Farfan et al., 2011), addig az Lpf2 esetében még nem állnak rendelkezésünkre ilyen adatok, főképp nem LEE-negatív törzsekből.

Mindenképpen további *in vitro* és *in vivo* kísérletek szükségesek tehát az Lpf2-nek az atípusos O157 törzsek adhéziójában játszott esetleges szerepének tisztázásához. E kísérletek fő közelebbi célja egyrészt az adhézióban szerepet játszó további faktorok – esetleges sejtfelszíni receptorok vagy az Lpf1-hez hasonlóan az extracelluláris mátrix fehérjék (Farfan et al., 2011) – másrészt az Lpf2 expresszióját szabályozó tényezők felderítése lehetne.

Vizsgálataink másik fontos célja volt a CDT-V-öt kódoló *cdt-V* operon genetikai környezetének megismerése, és a valószínűsíthetően ott található P2-szerű profág jellemzése.

A korábbi irodalmi adatokat (Janka et al., 2003, Friedrich et al., 2006, Allué-Guardia et al., 2011) kibővítve igazoltuk, hogy valóban egy P2-szerű profág hordozza a *cdt-V*-öt, és e profág teljes szekvenciája immár a rendelkezésünkre áll (Sváb et al., 2013b). A profág gének különböző CDT-termelő törzsek körében történő monitorozása alapján megállapítható, hogy e *cdt-V* hordozó profágoknak legalább három különböző leszármazási vonala létezik. Az egyik a T22-ben találhatóval azonos, vagy ahhoz nagyon hasonló, melyet az atípusos O157 törzsek hordoznak. A másik vonalnak több génje, mint például a *C* szabályozó gén, különbözik az előző leszármazási vonal génjeitől, integrációs helye is más, és az O157:NM EHEC törzsek hordozzák. Harmadik leszármazási vonalnak tekinthető az Allué-Guardia et al. (2011) által EHEC törzsekből izolált indukálható fág, melyről azonban csak minimális szekvencia-adatok állnak rendelkezésre.

Ezen profágok feltehetőleg egy közös őstől származnak, mely fág-transzdukcióval terjedt el a különböző törzsek közt. A fágoknak az eltérő gazdatörzsek genomjába történő integrációja, valamint a gazdákhöz való adaptációjuk vezethetett a körükben tapasztalható szekvencia-heterogenitáshoz, és legalábbis az első két esetben a fágok temperálódásához. Ezt támasztja alá Friedrich és munkatársainak megfigyelése is, akik a *cdt-V* termelő O157:H7 STEC törzsek között is jelentős klonális diverzitást tapasztaltak (Friedrich et al., 2006). A *cdt-V* terjedésének, és a hordozó profág evolúciójának felderítéséhez feltétlenül

további szekvencia-adatok, valamint esetlegesen *in vivo* fág-mobilizációs kísérletek szükségesek.

A fenti két virulencia operonnak és határoló régióinak szekvenciáját a T22 jelzésű, *E. coli* O157:H43 törzsben ismertük meg először, e törzsnek pedig később a teljes genom szekvenciáját is meghatároztuk draft genom szintig (Sváb et al., 2013c). Ez megerősítette azt, amire az *lpf*-tipizálás és a Clermont et al. (2000) által kidolgozott rendszer szerinti filogenetikai tipizálás eredménye is rámutatott: az eddig ismert O157 törzsekhez képest új genotípust képviselő, valóban atípusosnak mondható törzsről van szó. Genomjában az ismert kulcs virulencia gének integrációs helyei érintetlenek, ez felveti annak lehetőségét, hogy a törzs alkalmas lehet további virulenciagének felvételére. Bielaszewska et al. (2007) felhívják a figyelmet a patogén *E. coli* törzsek körében tapasztalható gyors genetikai átrendeződésekre és HGT-vel történő géncserékre, melynek segítségével nagyon rövid idő alatt keletkezhetnek új genotípusú, sőt új patotípusú törzsek, erre volt drámai példa a 2011-es németországi járványtörzsek által okozott megbetegedések kiemelkedően magas mortalitása és morbiditása (Weiser et al., 2013).

Az atípusos, Stx- és intimin-negatív *E. coli* O157 törzsek mindenképpen figyelmet érdemelnek, hiszen alkalmasak lehetnek számos további virulenciafaktor felvételére, ezért közvetett zoonotikus jelentőségük sem zárható ki. Ezen eredményeink összhangban állnak korábbi irodalmi megfigyelésekkel, melyek az Stx-negatív O157 törzsek klinikai jelentőségére mutattak rá (Friedrich et al., 2007; Bielaszewska et al., 2008). Az O157 szerocsoportú törzsek evolúciójával kapcsolatban több szerző is megállapította, hogy rendkívül gyorsan alakulnak ki újabb és újabb klonális csoportok (Bielaszewska et al., 2007; Kaper és Karmali 2008; Iguchi et al., 2011), alaposan megnehezítve e törzsek járványtani nyomon követését és diagnosztikáját. Ezekből következik, hogy a jövőben is fontos lesz a gyakori szero- és patotípusok mellett a ritkább szerotípusú vagy atípusos génkészletű törzsek vizsgálata, mely segíthet megérteni az O157 és más szerocsoportok genetikai változékonyságának hátterében álló mechanizmusokat, és pontosabban meghatározni a különböző virulenciafaktor készlettel rendelkező törzsek zoonotikus potenciálját.

7. Új tudományos eredmények

Az értekezés alapját képező munkánk során az alábbi új tudományos eredményeket értük el:

1. Meghatároztuk a szarvasmarha eredetű, atípusos *E. coli* O157 szerocsoportú törzsek *lpf* operonjainak genetikai típusait. Kimutattuk, hogy az atípusos *E. coli* O157 törzsek *lpf* operonjaik tekintetében is elkülönülnek az O157 szerocsoportba tartozó EHEC és EPEC törzsektől, mivel az atípusos törzsek csak az *lpf2-1* típust hordozzák, addig az EHEC és EPEC törzsek egységesen két típust, az *lpf1-3* és *lpf2-2*-t hordozzák.

2. Meghatároztuk az ECOR törzsgyűjtemény tagjainak *lpf* típusait, ennek során e törzsek közt eddig még nem ismert, vélhetően új típust képviselő *lpf* géneket detektáltunk.

3. Elsőként határoztuk meg az *lpf2* operon szekvenciáját szarvasmarha eredetű, atípusos *E. coli* O157 szerocsoportú törzsekben, kimutatva, hogy az *lpf2* operon e törzsek körében egy konzervált PAI-t alkot.

4. Elsőként határoztuk meg a *cdt-V* operont hordozó P2-szerű profág teljes nukleotid szekvenciáját, rámutatva, hogy a *cdt-V* operon valószínűleg HGT révén terjedt el a hordozó törzsek közt.

5. Megállapítottuk, hogy a P2-szerű profág gének többsége szero- és patotípustól függetlenül jelen van a CDT-V termelő *E. coli* törzsekben.

6. Különbségeket találtunk a CDT-V termelő atípusos *E. coli* O157 törzsek és a szintén CDT-V termelő O157:NM EHEC törzsek által hordozott P2-szerű gének eloszlásában: míg az atípusos törzsek a vizsgált húsz génből legalább tizenhétet hordoztak, addig az EHEC törzsek 15-16 közt számút, a hiányzó gének közt volt a P2-szerű fágok esetében filogenetikai jelentőséggel bíró *C* gén is. E különbségek valószínűleg a *cdt-V* hordozó P2-szerű profágok gazdához történt adaptációjából adódnak.

7. Elsőként határoztuk meg egy szarvasmarha eredetű, új genotípust képviselő, atípusos *E. coli* O157:H43 törzs teljes genom szekvenciáját draft genom szintig. Eredményeink szerint e szerotípus *E. coli* törzsei eddig nem ismert evolúciós állomást jelenthetnek a szorbitot nem bontó O157 szerocsoportbeli törzsek közt, és mivel kulcs virulenciagénjeik integrációs helyei érintetlenek, ezért potenciálisan patogén törzsekké alakulhatnak.

8. Irodalomjegyzék

- Alexa, P., Rychlik, I., Nejezchleb, A., Hamrik, J.: **Identification of enterotoxin producing strains of *Escherichia coli* by PCR and biological methods**, Vet. Med. (Praha), 42. 97–100, 1997.
- Allué-Guardia, A., García-Aljaro, C., Muniesa, M.: **Bacteriophage encoding cytolethal distending toxin type V induced from nonclinical *Escherichia coli* isolates**, Infect. Immun., 79. 3262-3272, 2011.
- Appleyard, R.K.: **Segregation of new lysogenic types during growth of a doubly lysogenic strain derived from *Escherichia coli* K12**. Genetics, 39. 440-452, 1954.
- Archer, C.T., Kim, J.F., Jeong, H., Park, J.H., Vickers, C.E., Lee S.Y., Nielsen, L.K.: **The genome sequence of *E. coli* W (ATCC 9637): comparative genome analysis and an improved genome-scale reconstruction of *E. coli***, BMC Genomics, 12. 2011.
- Asadulghani, M., Ogura, Y., Ooka, T., Itoh, T., Sawaguchi, A., Iguchi, A., Nakayama, K., Hayashi, T.: **The defective prophage pool of *Escherichia coli* O157: prophage-prophage interactions potentiate horizontal transfer of virulence determinants**, PLoS Pathog., 5. e1000408, 2009.
- Asakura, M., Hinenoya, A., Alam, M.S., Shima, K., Zahid, S.H., Shi, L., Sugimoto, N., Ghosh, A.N., Ramamurthy, T., Faruque, S.M., Nair, G.B., Yamasaki, S.: **An inducible lambdoid prophage encoding cytolethal distending toxin (*cdt-I*) and a type III effector protein in enteropathogenic *Escherichia coli***, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 104. 14483-14488, 2007.
- Bardiau, M., Labruzzo, S., Mainil, J.G.: **Putative adhesins of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* of serogroup O26 isolated from humans and cattle**, J. Clin. Microbiol., 47. 2090-2096, 2009.
- Belibasakis, G.N., Mattsson, A., Wang, Y., Chen, C., Johansson, A.: **Cell cycle arrest of human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: involvement of the cytolethal distending toxin**, APMIS, 112. 674-685, 2004.
- Berlanda Scorza, F., Doro, F., Rodríguez-Ortega, M.J., Stella, M., Liberatori, S., Taddei, A.R., Serino, L., Gomes Moriel, D., Nesta, B., Fontana, M.R., Spagnuolo, A., Pizza, M., Norais, N., Grandi, G.: **Proteomics characterization of outer membrane vesicles from the extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* deltatolr IHE3034 mutant**, Mol. Cell Proteomics, 7. 473-485, 2008.

- Bertin, Y., Boukhors, K., Livrelli, V., Martin, C.: **Localization of the insertion site and pathotype determination of the locus of enterocyte effacement of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* strains**, *Appl. Environ. Microbiol.*, 70. 61-68, 2004.
- Bielaszewska, M., Dobrindt, U., Gärtner, J., Gallitz, I., Hacker, J., Karch, H., Müller, D., Schubert, S., Schmidt, M.A., Sorsa, L.J., Zdziarski, J.: **Aspects of genome plasticity in *Escherichia coli***, *Int. J. Med. Microbiol.*, 297. 625-639, 2007.
- Bielaszewska, M., Fell, M., Greune, L., Prager, R., Fruth, A., Tschäpe, H., Schmidt, M.A., Karch, H.: **Characterization of cytolethal distending toxin genes and expression in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains of non-O157 serogroups**, *Infect. Immun.*, 72. 1812-1816, 2004.
- Bielaszewska, M., Middendorf, B., Köck, R., Friedrich, A.W., Fruth, A., Karch, H., Schmidt, A., Mellmann, A.: **Shiga toxin–negative attaching and effacing *Escherichia coli*: distinct clinical associations with bacterial phylogeny and virulence traits and inferred in-host pathogen evolution**, *Clin. Inf. Dis.*, 47. 208–17, 2008.
- Bielaszewska, M., Sinha, B., Kuczus, T., Karch, H.: **Cytolethal distending toxin from Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 causes irreversible G2/M arrest, inhibition of proliferation, and death of human endothelial cells**, *Infect. Immun.*, 73. 552-562, 2005.
- Bielaszewska, M., Stoewe, F., Fruth, A., Zhang, W., Prager, R., Brockmeyer, J., Mellmann, A., Karch, H., Friedrich, A.W.: **Shiga toxin, cytolethal distending toxin, and hemolysin repertoires in clinical *Escherichia coli* O91 isolates**, *J. Clin. Microbiol.*, 47. 2061-2066, 2009.
- Boesze-Battaglia, K., Besack, D., McKay, T., Zekavat, A., Otis, L., Jordan-Sciutto, K., Shenker, B.J.: **Cholesterol-rich membrane microdomains mediate cell cycle arrest induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cytolethal-distending toxin**, *Cell. Microbiol.*, 8. 823-836, 2006.
- Borriello, G., Lucibelli, M.G., De Carlo, E., Auriemma, C., Cozza, D., Ascione, G., Scognamiglio, F., Iovane, G., Galiero, G.: **Characterization of enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), Shiga-toxin producing *E. coli* (STEC) and necrotoxigenic *E. coli* (NTEC) isolated from diarrhoeic mediterranean water buffalo calves (*Bubalus bubalis*)**, *Res. Vet. Sci.*, 93. 18-22, 2012.
- Bouzari, S., Oloomi, M., Oswald, E.: **Detection of the cytolethal distending toxin locus *cdtb* among diarrheagenic *Escherichia coli* isolates from humans in Iran**, *Res. Microbiol.*, 156. 137-144, 2005.
- Brüssow, H., Canchaya, C., Hardt, W.: **Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion**, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 68. 560-602, 2004.

- Brzuszkiewicz, E., Thürmer, A., Schuldes, J., Leimbach, A., Liesegang, H., Meyer, F., Boelter, J., Petersen, H., Gottschalk, G., Daniel, R.: **Genome sequence analyses of two isolates from the recent *Escherichia coli* outbreak in Germany reveal the emergence of a new pathotype: Entero-Aggregative-Haemorrhagic *Escherichia coli* (EAHEC)**, Arch. Microbiol., 193. 883-891, 2011.
- Campos, L.C., Whittam, T.S., Gomes, T.A., Andrade, J.R., Trabulsi, L.R.: ***Escherichia coli* serogroup O111 includes several clones of diarrheagenic strains with different virulence properties**, Infect Immun, 62. 3282-3288, 1994.
- Caprioli, A., Morabito, S., Brugère, H., Oswald, E.: **Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and transmission**, Vet. Res., 36. 289-311, 2005.
- Cergole-Novella, M.C., Nishimura, L.S., Dos Santos L.F., Irino K., Vaz, T.M., Bergamini, A.M., Guth, B.E.: **Distribution of virulence profiles related to new toxins and putative adhesins in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from diverse sources in Brazil**, FEMS Microbiol. Lett., 274. 329-334, 2007.
- Chaudhuri R.R., Sebahia, M., Hobman, J.L., Webber, M.A., Leyton, D.L., Goldberg, M.D., Cunningham, A.F., Scott-Tucker, A., Ferguson, P.R., Thomas, C.M., Frankel, G., Tang, C.M., Dudley, E.G., Roberts, I.S., Rasko, D.A., Pallen, M.J., Parkhill, J., Nataro, J.P., Thomson, N.R., Henderson, I.R.: **Complete genome sequence and comparative metabolic profiling of the prototypical enteroaggregative *Escherichia coli* strain 042**, PLoS One, 5. e8801, 2010.
- China, B., Pirson, V., Mainil, J.: **Typing of bovine attaching and effacing *Escherichia coli* by multiplex *in vitro* amplification virulence-associated genes**, Appl. Environ. Microbiol., 62. 3462-3465, 1996.
- Clark, C.G., Johnson, S.T., Easy, R.H., Campbell, J.L., Rodgers, F.G.: **PCR for detection of *cdt-III* and the relative frequencies of cytolethal distending toxin variant-producing *Escherichia coli* isolates from humans and cattle**, J. Clin. Microbiol., 40. 2671-2674, 2002.
- Clermont, O., Bonacorsi, S., Bingen, E.: **Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group**, Appl. Environ. Microbiol., 66. 4555-4558, 2000.
- Comayras, C., Tasca, C., Pérès, S.Y., Ducommun, B., Oswald, E., De Rycke, J.: ***Escherichia coli* cytolethal distending toxin blocks the HeLa cell cycle at the G2/M transition by preventing *cdc2* protein kinase dephosphorylation and activation**, Infect. Immun., 65. 5088-5095, 1997.
- Cortes-Bratti, X., Chavez-Olarte, E., Lagergård, T., Thelestam, M.: **Cellular internalization of cytolethal distending toxin from *Haemophilus ducreyi***, Infect. Immun., 68. 6903-6911, 2000.

- Cortes-Bratti, X., Karlsson, C., Lagergård, T., Thelestam, M., Frisan, T.: **The *Haemophilus ducreyi* cytolethal distending toxin induces cell cycle arrest and apoptosis via the DNA damage checkpoint pathways**, *J. Biol. Chem.*, 276. 5296-5302, 2001.
- Croxen, M.A., Law, R.J., Scholz, R., Keeney, K.M., Wlodarska, M., Finlay, B.B.: **Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli***, *Clin. Microbiol. Rev.*, 26. 822-880, 2013.
- CSUROS, M., JUHOS, S., BERCESE, A.: Fast mapping and precise alignment of AB SOLiD color reads to reference DNA. In: *Proceedings of the 10th International Conference on Algorithms in Bioinformatics*. Szerk.: MOULTON, V., SINGH, M. Berlin: Springer-Verlag, 2010. p. 176-188.
- De Rycke, J., Plassiart, G.: **Toxic effects for lambs of cytotoxic necrotising factor from *Escherichia coli***, *Res. Vet. Sci.*, 49. 349-354, 1990.
- Dobrindt, U.: **(Patho-)genomics of *Escherichia coli***, *Int. J. Med. Microbiol.*, 295. 357-371, 2005.
- Dobrindt, U., Blum-Oehler, G., Nagy G., Schneider G., Johann, A., Gottschalk, G., Hacker, J.: **Genetic structure and distribution of four pathogenicity islands (PAI I(536) to PAI IV(536)) of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536**, *Infect. Immun.*, 70. 6365-6370, 2002.
- Dobrindt, U., Chowdary, M.G., Krumbholz, G., Hacker, J.: **Genome dynamics and its impact on evolution of *Escherichia coli***, *Med. Microbiol. Immunol.*, 199. 145-154, 2010.
- Dobrindt, U., Hochhut, B., Hentschel, U., Hacker, J.: **Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms**, *Nat. Rev. Microbiol.*, 2. 414–424, 2004.
- Doughty, S., Sloan, J., Bennett-Wood, V., Robertson, M., Robins-Browne, R.M., Hartland, E.L.: **Identification of a novel fimbrial gene cluster related to long polar fimbriae in locus of enterocyte effacement-negative strains of enterohaemorrhagic *Escherichia coli***, *Infect. Immun.*, 70. 6761-6769, 2002.
- Dubois, D., Delmas, J., Cady, A., Robin, F., Sivignon, A., Oswald, E., Bonnet, R.: **Cyclomodulins in urosepsis strains of *Escherichia coli***, *J. Clin. Microbiol.*, 48. 2122-2129, 2010.
- Echeverria, P., Seriwatana, J., Taylor, D.N., Changchawalit, S., Smyth, C.J., Twohig, J., Rowe, B.: **Plasmids coding for colonization factor antigens I and II, heat-labile enterotoxin, and heat-stable enterotoxin A2 in *Escherichia coli***, *Infect. Immun.*, 74. 1062-1071, 1986.
- Elwell, C.A., Dreyfus, L.A.: **DNase I homologous residues in CdtB are critical for cytolethal distending toxin-mediated cell cycle arrest**, *Mol. Microbiol.*, 37. 952-963, 2000.

- Escobar-Páramo, P., Clermont, O., Blanc-Potard, A., Bui, H., Le Bougénéec, C., Denamur, E.: **A specific genetic background is required for acquisition and expression of virulence factors in *Escherichia coli***, *Mol. Biol. Evol.*, 21. 1085-1094, 2004.
- Eshraghi, A., Maldonado-Arocho, F.J., Gargi, A., Cardwell, M.M., Prouty, M.G., Blanke, S.R., Bradley, K.A.: **Cytolethal distending toxin family members are differentially affected by alterations in host glycans and membrane cholesterol**, *J. Biol. Chem.*, 285. 18199-18207, 2010.
- Farfan, M.J., Cantero, L., Vidal, R., Botkin, D.J., Torres, A.G.: **Long polar fimbriae of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 bind to extracellular matrix proteins**, *Infect Immun.*, 79. 3744-3750, 2011.
- Farmer, J.J.3rd, Davis, B.R.: **H7 antiserum-sorbitol fermenting medium: a single tube screening medium for detecting *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis**, *J. Clin. Microbiol.*, 22. 620-625, 1985.
- Feng, P.C.H., Monday, S.R., Lacher, D.W., Allison, L., Siitonen, A., Keys, C., Eklund, M., Nagano, H., Karch, H., Keen, J., Whittam, T.S.: **Genetic diversity among clonal lineages within *Escherichia coli* O157:H7 stepwise evolutionary model**, *Emerging Infect. Dis.*, 13. 1701-1706, 2007.
- Fitzhenry, R., Dahan, S., Torres, A.G., Chong, Y., Heuschkel, R., Murch, S.H., Thomson, M., Kaper, J.B., Frankel, G., Phillips, A.D.: **Long polar fimbriae and tissue tropism in *Escherichia coli* O157:H7**, *Microbes Infect.*, 8. 1741-1749, 2006.
- Fox, J.G., Rogers, A.B., Whary, M.T., Ge, Z., Taylor, N.S., Xu, S., Horwitz, B.H., Erdman, S.E.: **Gastroenteritis in NF-kappaB-deficient mice is produced with wild type *Campylobacter jejuni* but not with *C. jejuni* lacking cytolethal distending toxin despite persistent colonization with both strains**, *Infect. Immun.*, 72. 1116-1125, 2004.
- Friedrich, A.W., Lu, S., Bielaszewska, M., Prager, R., Bruns, P., Xu, J., Tschäpe, H., Karch, H.: **Cytolethal distending toxin in *Escherichia coli* O157:H7: spectrum of conservation, structure and endothelial toxicity**, *J. Clin. Microbiol.*, 44. 1844-1846, 2006.
- Friedrich, A.W., Zhang, W., Bielaszewska, M., Mellmann, A., Köck, R., Fruth, A., Tschäpe, H., Karch, H.: **Prevalence, virulence profiles, and clinical significance of Shiga toxin-negative variants of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 infection in humans**, *Clin. Infect. Dis.*, 45. 39-45, 2007.
- Galli, L., Miliwebsky, E., Irino, K., Leotta, G., Torres, A.G.: **Virulence profile comparison between LEE-negative Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains isolated from cattle and humans**, *Vet. Microbiol.*, 143. 307-313, 2010a.
- Galli, L., Torres, A.G., Rivas, M.: **Identification of the long polar fimbriae gene variants in the locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxin-producing *Escherichia coli***

- strains isolated from humans and cattle in Argentina**, FEMS Microbiol. Lett., 308. 123-129, 2010b.
- Garcia, E., Chain, P., Elliott, J.M., Bobrov, A.G., Motin, V.L., Kirillina, O., Lao, V., Calendar, R., Filippov, A.A.: **Molecular characterization of L-413C, a P2-related plague diagnostic bacteriophage**, Virology, 372. 85-96, 2008.
- Gargi, A., Reno, M., Blanke, S.R.: **Bacterial toxin modulation of the eukaryotic cell cycle: are all cytolethal distending toxins created equally?** Front. Cell. Infect. Microbiol., 2. 124, 2012.
- Ge, Z., Schauer, D.B., Fox, J.G.: **In vivo virulence properties of bacterial cytolethal-distending toxin**, Cell. Microbiol., 10. 1599–1607, 2008.
- Ghanbarpour, R., Oswald, E.: **Characteristics and virulence genes of *Escherichia coli* isolated from septicemic calves in southeast of Iran**, Trop. Anim. Health Prod., 41. 1091-1099, 2009.
- Griffin, P.M., Tauxe, R.V.: **The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uraemic syndrome**, Epidemiol. Rev., 13. 60-98, 1991.
- Guerra, L., Teter, K., Lilley, B.N., Stenerlöw, B., Holmes, R.K., Ploegh, H.L., Sandvig, K., Thelestam, M., Frisan, T.: **Cellular internalization of cytolethal distending toxin: a new end to a known pathway**, Cell. Microbiol., 7. 921-934, 2005.
- Guerra, L., Nemeč, K.N., Massey, S., Tatulian, S.A., Thelestam, M., Frisan, T., Teter, K.: **A novel mode of translocation for cytolethal distending toxin**, Biochim. Biophys. Acta, 1793. 489-495, 2009.
- Guerra, L., Cortes-Bratti, X., Guidi, R., Frisan, T.: **The biology of the cytolethal distending toxins**, Toxins (Basel), 3. 172-190, 2011.
- Gyles, C.L.: **Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview**, J. Anim. Sci., 85(13Suppl). E45-E62, 2007.
- HACKER, J., KAPER, J.B.: The Concept of Pathogenicity Islands. In: *Pathogenicity Islands and Other Mobile Virulence Elements*. Szerk.: KAPER, J.B., HACKER, J. Washington: ASM Press, 1999. p. 1-11.
- Haghjoo, E., Galán, J.E.: ***Salmonella* Typhi encodes a functional cytolethal distending toxin that is delivered into host cells by a bacterial internalization pathway**, Procl. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 101. 4614-4619, 2004.
- Hassane, D.C., Lee, R.B., Pickett, C.L.: ***Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin promotes DNA repair responses in normal human cells**, Infect. Immun., 71. 541-545, 2003.

- Hayashi, F., Smith, K.D., Ozisnky, A., Hawn, T.R., Yi, E.C., Goodlett, D.R., Eng, J.K., Akira, S., Underhill, D.M., Aderem, A.: **The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5**, *Nature*, 410. 1099-1103, 2001a.
- Hayashi, T., Makino, K., Ohnishi, M., Kurokawa, K., Ishii, K., Yokoyama, K., Han, C.G., Ohtsubo, E., Nakayama, K., Murata, T., Tanaka, M., Tobe, T., Iida, T., Takami, H., Honda, T., Sasakawa, C., Ogasawara, N., Yasunaga, T., Kuhara, S., Shiba, T., Hattori, M., Shinagawa, H.: **Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12**, *DNA Res.*, 8. 11-22, 2001b.
- Hertman, I., Luria, S.E.: **Transduction studies on the role of a *rec*⁺ gene in the ultraviolet induction of prophage lambda**, *J. Mol. Biol.*, 23. 117-133, 1967.
- Heywood, W., Henderson, B., Nair, S.P.: **Cytolethal distending toxin: creating a gap in the cell cycle**, *J. Med. Microbiol.*, 54. 207–216, 2005.
- Hinenoya, A., Naigita, A., Ninomiya, K., Asakura, M., Shima, K., Seto, K., Tsukamoto, T., Ramamurthy, T., Faruque, S.M., Yamasaki, S.: **Prevalence and characteristics of cytolethal distending toxin-producing *Escherichia coli* from children with diarrhea in Japan**, *Microbiol. Immunol.*, 53(4). 206-215, 2009.
- Ideses, D., Biran, D., Gophna, U., Levy-Nissenbaum, O., Ron, E.Z.: **The *lpf* operon of invasive *Escherichia coli***, *Int. J. Med. Microbiol.*, 295. 227–236, 2005.
- Iguchi, A., Shirai, H., Seto, K., Ooka, T., Ogura, Y., Hayashi, T., Osawa, K., Osawa, R.: **Wide distribution of O157-antigen biosynthesis gene clusters in *Escherichia coli***, *PLoS One*, 6. e23250, 2011.
- Iguchi, A., Thomson, N.R., Ogura, Y., Saunders, D., Ooka, T., Henderson, I.R., Harris, D., Asadulghani, M., Kurokawa, K., Dean, P., Kenny, B., Quail, M.A., Thurston, S., Dougan, G., Hayashi, T., Parkhill, J., Frankel, G.: **Complete genome sequence and comparative genome analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* O127:H6 strain E2348/69**, *J. Bacteriol.*, 191. 347-354, 2009.
- Janka, A., Bielaszewska, M., Dobrindt, U., Greune, L., Schmidt, M.A., Karch, H.: **Cytolethal distending toxin gene cluster in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H- and O157:H7: characterization and evolutionary considerations**, *Infect. Immun.*, 71. 3634-3638, 2003.
- Jinadasa, R.N., Bloom, S.E., Weiss, R.S., Duhamel, G.E.: **Cytolethal distending toxin: a conserved bacterial genotoxin that blocks cell cycle progression, leading to apoptosis of a broad range of mammalian cell lineages**, *Microbiology*, 157. 1851-1875, 2011.

- JOHNSON, J.R.: Evolution of pathogenic *Escherichia coli*. In: *Escherichia coli. Virulence mechanisms of a versatile pathogen*. Szerk.: DONNENBERG, M.S. San Diego: Academic Press, Elsevier, 2002. p. 55-77.
- Johnson, J.R., Oswald, E., O'Bryan, T.T., Kuskowski, M.A., Spanjaard, L.: **Phylogenetic distribution of virulence-associated genes among *Escherichia coli* isolates associated with neonatal bacterial meningitis in the Netherlands**, *J. Infect. Dis.*, 185. 774-784, 2002.
- Johnson, T.J., DeBroy, C., Belton, S., Williams, M.L., Lawrence, M., Nolan, L.K., Thorsness, J.L.: **Pyrosequencing of the Vir plasmid of necrotoxicogenic *Escherichia coli***, *Vet. Microbiol.*, 144. 100-109, 2010.
- Johnson, T.J., Kariyawasam, S., Wannemuehler, Y., Mangiamele, P., Johnson, S.J., Doetkott, C., Skyberg, J.A., Lynne, A.M., Johnson, J.R., Nolan, L.K.: **The genome sequence of avian pathogenic *Escherichia coli* strain O1:K1:H7 shares strong similarities with human extraintestinal pathogenic *E. coli* genomes**, *J. Bacteriol.*, 189. 3228-3236, 2007.
- Johnson, W.M., Lior, H.: **A new heat-labile cytolethal distending toxin (CLDT) produced by *Escherichia coli* strains isolated from clinical material**, *Microb. Pathog.*, 4. 103-113. 1988.
- Jordan, D.M., Cornick, N., Torres, A.G., Dean-Nystrom, E.A., Kaper, J.B., Moon, H.W.: **Long polar fimbriae contribute to colonization by *Escherichia coli* O157:H7 *in vivo***, *Infect. Immun.*, 72. 6168-6171, 2004.
- Kadhun, H.J., Ball, H.J., Oswald, E., Rowe, M.T.: **Characteristics of cytotoxic necrotizing factor and cytolethal distending toxin producing *Escherichia coli* strains isolated from meat samples in Northern Ireland**, *Food Microbiol.*, 23. 491-497, 2006.
- Kaper, J.B.: **Pathogenic *Escherichia coli***, *Int. J. Med. Microbiol.*, 295. 355-356, 2005.
- Kaper, J.B., Karmali, M.A.: **The continuing evolution of a bacterial pathogen**, *Procl. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 105. 4535-4536, 2008.
- Kaper, J.B., Nataro, J.P., Mobley, H.L.: **Pathogenic *Escherichia coli***, *Nat. Rev. Microbiol.*, 2. 123-140, 2004.
- Karch, H., Böhm, H., Schmidt, H., Gunzer, F., Aleksic, S., Heesemann, J.: **Clonal structure and pathogenicity of Shiga-like toxin producing, sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:H-**, *J. Clin. Microbiol.*, 31. 1200-1205, 1993.
- Karch, H., Denamur, E., Dobrindt, U., Finlay, B.B., Hengge, R., Johannes, L., Ron, E.Z., Tønjum, T., Sansonetti, P.J., Vicente, M.: **The enemy within us: lessons from the 2011 European *Escherichia coli* O104:H4 outbreak**, *EMBO Mol. Med.*, 4. 841-848, 2012.
- Kim, J.H., Kim, J.C., Choo, Y.A., Jang, H.C., Choi, Y.H., Chung, J.K., Cho, S.H., Park, M.S., Lee B.K.: **Detection of cytolethal distending toxin and other virulence**

- characteristics of enteropathogenic *Escherichia coli* isolates from diarrhoeal patients in Republic of Korea**, J. Microbiol. Biotechnol., 19. 525-529, 2009.
- Konowalchuk, J., Speirs, J.I., Stavric, S.: **Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli***, Infect. Immun., 18. 775-779, 1977.
- Kulasekara, B.R., Jacobs, M., Zhou, Y., Wu, Z., Sims, E., Saenphimmachak, C., Rohmer, L., Ritchie, J.M., Radey, M., McKeivitt, M., Freeman, T.L., Hayden, H., Haugen, E., Gillet, W., Fong, C., Chang, J., Beskhlebnyaya, V., Waldor, M.K., Samadpour, M., Whittam, T.S., Kaul, R., Brittnacher, M., Miller, S.I.: **Analysis of the genome of *Escherichia coli* O157:H7 2006 spinach-associated outbreak isolate indicates candidate genes that may enhance virulence**, Infect. Immun., 77. 3713-3721, 2009.
- Lara-Tejero, M., Galán, J.E.: **CdtA, CdtB and CdtC form a tripartite complex that is required for cytolethal distending toxin activity**, Infect. Immun., 69. 4358-4365, 2001.
- Larina, V.S., Anisimov, P.I., Adamov, A.K.: **A novel strain of plague bacteriophage for identification of *Pasteurella pestis***, Probl. Particularly Dangerous Infect., 11. 132-136, 1970.
- Lee, R.B., Hassane, D.C., Cottle, D.L., Pickett, C.L.: **Interactions of *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin subunits CdtA and CdtC with HeLa cells**, Infect. Immun., 71. 4883-4890, 2003.
- Levine, M.M., Xu, J.G., Kaper, J.B., Lior, H., Prado, V., Tall, B., Nataro, J., Karch, H., Wachsmuth, K.: **A DNA probe to identify enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and other serotypes that cause hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome**, J. Infect. Dis., 156. 175-182, 1987.
- Lewis, D.A., Stevens, M.K., Latimer, J.L., Ward, C.K., Deng, K., Blick, R., Lumbley, S.R., Ison, C.A., Hansen, E.J.: **Characterization of *Haemophilus ducreyi* cdtA, cdtB, and cdtC mutants in *in vitro* and *in vivo* systems**, Infect. Immun., 69. 5626-5634, 2001.
- Lim, J.Y., Yoon, J.W., Hovde C.J.: **A brief overview of *Escherichia coli* O157:H7 and its plasmid O157**, J. Microbiol. Biotechnol., 20. 5-14, 2010.
- Lloyd, S.J., Ritchie, J.M., Rójas-Lopez, M., Blumentritt, C.A., Popov, V.L., Greenwich, J.L., Waldor, M.K., Torres, A.G.: **A double, long polar fimbria mutant of *Escherichia coli* O157:H7 expresses curli and exhibits reduced *in vivo* colonization**, Infect. Immun., 80. 914-920, 2012.
- Mag T., Nógrády N., Herpay M., Tóth I., Rozgonyi F.: **Characterisation of verotoxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Hungary over a 7-year period**, Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 29. 249-252, 2010.
- Marchès, O., Ledger, T.N., Boury, M., Ohara, M., Tu, X., Goffaux, F., Mainil, J., Rosenshine, I., Sugai, M., De Rycke, J., Oswald E.: **Enteropathogenic and enterohemorrhagic**

- Escherichia coli* deliver a novel effector called Cif, which blocks cell cycle G2/M transition**, Mol. Microbiol., 50. 1553-1567, 2003.
- McAuley, J.L., Linden, S.K., Png, C.W., King, R.M., Pennington, H.L., Gendler, S.J., Florin, T.H., Hill, G.R., Korolik, V., McGuckin, M.A.: **MUC1 cell surface mucin is a critical element of the mucosal barrier to infection**, J. Clin. Invest., 117. 2313-2324, 2007.
- McSweeney, L.A., Dreyfus, L.A.: **Nuclear localization of the *Escherichia coli* cytolethal distending toxin CdtB subunit**, Cell. Microbiol., 6. 447-458, 2004.
- McSweeney, L.A., Dreyfus, L.A.: **Carbohydrate-binding specificity of the *Escherichia coli* cytolethal distending toxin CdtA-II and CdtC-II subunits**, Infect. Immun., 73. 2051-2060, 2005.
- Mellmann, A., Bielaszewska, M., Köck, R., Friedrich, A.W., Fruth, A., Middendorf, B., Harmsen, D., Schmidt, M.A., Karch, H.: **Analysis of collection of hemolytic uremic syndrome-associated enterohemorrhagic *Escherichia coli***, Emerging Infect. Dis., 14. 1287-1290, 2008.
- Mellmann, A., Harmsen, D., Cummings, C.A., Zentz, E.B., Leopold, S.R., Rico, A., Prior, K., Szczepanowski, R., Ji, Y., Zhang, W., McLaughlin, S.F., Henkhaus, J.K., Bielaszewska, M., Prager, R., Brzoska, P.M., Moore, R.L., Guenther, S., Rothberg, J.M., Karch, H.: **Prospective genomic characterization of the german enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 outbreak by rapid next generation sequencing technology**, PLoS One, 6. e22751, 2011.
- Newton, H.J., Sloan, J., Bennett-Wood, V., Adams, L.M., Robins-Browne, R.M., Hartland, E.L.: **Contribution of long polar fimbriae to the virulence of rabbit-specific enteropathogenic *Escherichia coli***, Infect. Immun., 72. 1230-1239, 2004.
- Nagy B., Fekete P.Z.: **Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals**, Vet. Res., 30. 259-284, 1999.
- Nagy B., Tóth I., Mainil, J.G., Oswald, E.: **Nekrotoxikus *Escherichia coli* (NTEC) törzsek magyarországi előfordulása és jellemzése**, Magy. Állatorv. Lapja, 122. 751–758, 2000.
- Nagy B., Whipp, S.C., Imberechts, H., Bertschinger, H.U., Dean-Nystrom, E.A., Casey, T.A., Salajka, E.: **Biological relationship between F18ab and F18ac fimbriae of enterotoxigenic and verotoxigenic *Escherichia coli* from weaned pigs with oedema disease or diarrhoea**, Microb. Pathog., 22. 1-11, 1997.
- Nesić, D., Hsu, Y., Stebbins, C.E.: **Assembly and function of a bacterial genotoxin**, Nature, 429. 429-433, 2004.
- Nilsson, A.S., Haggård-Ljungquist, E.: **Evolution of P2-like phages and their impact on bacterial evolution**, Res. Microbiol., 158. 311-317, 2007.

- Nilsson, A.S., Karlsson, J.L., Haggård-Ljungquist, E.: **Site-specific recombination links the evolution of P2-like coliphages and pathogenic enterobacteria**, *Mol. Biol. Evol.*, 21. 1-13, 2004.
- Nilsson, H., Cardoso-Palacios, C., Haggård-Ljungquist, E., Nilsson, A.S.: **Phylogenetic structure and evolution of regulatory genes and integrases of P2-like phages**, *Bacteriophage*, 1. 207-218, 2011.
- Nougayrède, J., Homburg, S., Taieb, F., Boury, M., Brzuszkiewicz, E., Gottschalk, G., Buchrieser, C., Hacker, J., Dobrindt, U., Oswald, E.: ***Escherichia coli* induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells**. *Science*, 313. 848-850, 2006.
- Nougayrède, J., Taieb, F., DeRycke, J., Oswald, E.: **Cyclomodulins: bacterial effectors that modulate the eukaryotic cell cycle**, *Trends Microbiol.*, 13. 103-110, 2005.
- Nowicki, B., Labigne, A., Moseley, S., Hull, R., Hull, S., Moulds, J.: **The Dr hemagglutinin, afimbrial adhesins AFA-I and AFA-III, and F1845 fimbriae of uropathogenic and diarrhea-associated *Escherichia coli* belong to a family of hemagglutinins with Dr receptor recognition**, *Infect. Immun.*, 58. 279-281, 1990.
- O'Brien, A.D., Lively, T.A., Chen, M.E., Rothman, S.W., Formal, S.B.: ***Escherichia coli* O157:H7 strains associated with haemorrhagic colitis in the United States produce a *Shigella dysenteriae* 1-like cytotoxin**, *Lancet*, i. 702, 1983.
- Ochman, H., Selander, R.K.: **Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations**, *J. Bacteriol.*, 157. 690-693, 1984.
- Odegrip, R., Nilsson, A.S., Haggård-Ljungquist, E.: **Identification of a gene encoding a functional reverse transcriptase within a highly variable locus in the P2-like coliphages**, *J. Bacteriol.*, 188. 1643-1647, 2006.
- Ogura, Y., Ooka, T., Iguchi, A., Toh, H., Asadulghani, M., Oshima, K., Kodama, T., Abe, H., Nakayama, K., Kurokawa, K., Tobe, T., Hattori, M., Hayashi, T.: **Comparative genomics reveal the mechanism of the parallel evolution of O157 and non-O157 enterohemorrhagic *Escherichia coli***, *Procl. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 106. 17939-17944, 2009.
- Ohnishi, M., Terajima, J., Kurokawa, K., Nakayama, K., Murata, T., Tamura, K., Ogura, Y., Watanabe, H., Hayashi, T.: **Genomic diversity of *Escherichia coli* O157 revealed by whole-genome PCR scanning**, *Procl. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 99. 17043-17048, 2002.
- Okeke, I.N., Lamikanra, A., Steinrück, H., Kaper, J.B.: **Characterization of *Escherichia coli* strains from cases of childhood diarrhea in provincial southwestern Nigeria**, *J. Clin. Microbiol.*, 38. 7-12, 2000.
- Okhuysen, P.C., DuPont, H.: **Enterohemorrhagic *Escherichia coli*: a cause of acute and persistent diarrhea of worldwide importance**, *J. Infect. Dis.*, 202. 503-505, 2012.

- Orth, D., Grif, K., Dierich, M.P., Würzner, R.: **Cytolethal distending toxins in Shiga-toxin producing *Escherichia coli*: alleles, serotype distribution and biological effects**, J. Med. Microbiol., 55. 1487-1492, 2006.
- Osek, J.: **Detection of cytolethal distending toxin genes in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from different sources**, Bull. Vet. Inst. Pulawy, 49. 153-156, 2005.
- Osek, J., Weiner, M., Hartland, E.L.: **Prevalence of the *lpf*_{O113} gene cluster among *Escherichia coli* O157 isolates from different sources**, Vet. Microbiol., 96. 259-266, 2003.
- Oshima, K., Toh, H., Ogura, Y., Sasamoto, H., Morita, H., Park, S.H., Ooka, T., Iyoda, S., Taylor, T.D., Hayashi, T., Itoh, K., Hattori, M.: **Complete genome sequence and comparative analysis of the wild-type commensal *Escherichia coli* strain SE11 isolated from a healthy adult**, DNA Res., 15. 375-386, 2008.
- Oswald, E., Nougayrède, J., Taieb, F., Sugai, M.: **Bacterial toxins that modulate host cell-cycle progression**, Curr. Opin. Microbiol., 8. 83-91, 2005.
- Oswald, E., Schmidt, H., Morabito, S., Karch, H., Marchès, O., Caprioli, A.: **Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: characterization of a new intimin variant**, Infect. Immun., 68. 64-71, 2000.
- Pandey, M., Khan, A., Das, S.C., Sarkar, B., Kahali, S., Chakraborty, S., Chattopadhyay, S., Yamasaki, S., Takeda, Y., Nair, G.B., Ramamurthy, T.: **Association of cytolethal distending toxin locus *cdtB* with enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from patients with acute diarrhea in Calcutta, India**, J. Clin. Microbiol., 41. 5277-5281, 2003.
- Paton, A.W., Srimanote, P., Talbot, U.M., Wang, H., Paton, J.C.: **A new family of potent AB(5) cytotoxins produced by Shiga toxigenic *Escherichia coli***, J. Exp. Med., 200. 35-46, 2004.
- Pérès, S.Y., Marchès, O., Daigle, F., Nougayrède, J.P., Hérault, F., Tasca, C., De Rycke, J., Oswald, E.: **A new cytolethal distending toxin (CDT) from *Escherichia coli* producing CNF2 blocks hela cell division in G2/M phase**, Mol. Microbiol., 24. 1095-1107, 1997.
- Perna, N.T., Plunkett, G. 3rd, Burland, V., Mau, B., Glasner, J.D., Rose, D.J., Mayhew, G.F., Evans, P.S., Gregor, J., Kirkpatrick, H.A., Pósfai G., Hackett, J., Klink, S., Boutin, A., Shao, Y., Miller, L., Grotbeck, E.J., Davis, N.W., Lim, A., Dimalanta, E.T., Potamosis, K.D., Apodaca, J., Anantharaman, T.S., Lin, J., Yen, G., Schwartz, D.C., Welch, R.A., Blattner, F.R.: **Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli***, Nature, 409. 529-533, 2001.

- Pickett, C.L., Cottle, D.L., Pesci, E.C., Bikah, G.: **Cloning, sequencing, and expression of the *Escherichia coli* cytolethal distending toxin genes**, *Infect. Immun.*, 62. 1046-1051, 1994.
- Purdy, D., Buswell, C.M., Hodgson, A.E., McAlpine, K., Henderson, I., Leach, S.A.: **Characterisation of cytolethal distending toxin (CDT) mutants of *Campylobacter jejuni***, *J. Med. Microbiol.*, 49. 473-479, 2000.
- Rasko, D.A., Rosovitz, M.J., Myers, G.S., Mongodin, E.F., Fricke, W.F., Gajer, P., Crabtree, J., Sebaihia, M., Thomson, N.R., Chaudhuri, R., Henderson, I.R., Sperandio, V., Ravel, J.: **The pangenome structure of *Escherichia coli*: comparative genomic analysis of *E. coli* commensal and pathogenic isolates**, *J. Bacteriol.*, 190. 6881-6893, 2008.
- Recktenwald, J., Schmidt, H.: **The nucleotide sequence of Shiga toxin (Stx) 2e-encoding phage phiP27 is not related to other Stx phage genomes, but the modular genetic structure is conserved**, *Infect. Immun.*, 70. 1896-1908, 2002.
- Reid, S.D., Betting, D.J., Whittam, T.S.: **Molecular detection and identification of intimin alleles in pathogenic *Escherichia coli* by multiplex PCR**, *J. Clin. Microbiol.*, 37. 2719-2722, 1999.
- Riley, L.W., Remis, R.S., Helgerson, S.D., McGee H.B., Wells, J.G., Davis, B.R., Hebert, R.J., Olcott, E.S., Johnson, L.M., Hargrett, N.T., Blake, P.A., Cohen, M.L.: **Haemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype**, *N. Eng. J. Med.*, 308. 681-685. 1983.
- Rojas-López, M., Arenas-Hernández, M.M.P., Medrano-López, A., Martínez de la Peña, C.F., Puente, J.L., Martínez-Laguna, Y., Torres, A.G.: **Regulatory control of the *Escherichia coli* O157:H7 *lpf1* operon by H-NS and Ler**, *J. Bacteriol.*, 193. 1622-1632, 2011.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T.: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982.
- Schmidt, H.: **Shiga-toxin-converting bacteriophages**, *Res. Microbiol.*, 152. 687-695, 2001.
- Scott, D.A., Kaper, J.B.: **Cloning and sequencing of the genes encoding *Escherichia coli* cytolethal distending toxin**, *Infect. Immun.*, 62. 244-251, 1994.
- Shen, S., Mascarenhas, M., Morgan, R., Rahn, K., Karmali, M.A.: **Identification of four fimbria-encoding genomic islands that are highly specific for verocytotoxin-producing *Escherichia coli* serotype O157 strains**, *J. Clin. Microbiol.*, 65. 3840-3850, 2005.
- Shenker, B.J., Dlakic, M., Walker, L.P., Besack, D., Jaffe, E., LaBelle, E., Boesze-Battaglia, K.: **A novel mode of action for a microbial-derived immunotoxin: the cytolethal distending toxin subunit B exhibits phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate phosphatase activity**, *J. Immunol.*, 178. 5099-5108, 2007.

- Shepard, S.M., Danzeisen, J.L., Isaacson, R.E., Seemann, T., Achtman, M., Johnson, T.J.: **Genome sequences and phylogenetic analysis of K88- and F18-positive porcine enterotoxigenic *Escherichia coli***, *J. Bacteriol.*, 194. 395-405, 2012.
- Slanec, T., Fruth, A., Creuzburg, K., Schmidt, H.: **Molecular analysis of virulence profiles and Shiga toxin genes in food-borne Shiga toxin-producing *Escherichia coli***, *Appl. Environ. Microbiol.*, 75. 6187-6197, 2009.
- Sváb D., Galli, L., Horváth B., Maróti G., Dobrindt, U., Torres, A.G., Rivas, M., Tóth I.: **The long polar fimbriae operon and its flanking regions in bovine *Escherichia coli* O157:H43 and STEC O136:H12 strains**, *Pathog. Dis.*, 68. 1-7, 2013a.
- Sváb D., Horváth B., Maróti G., Dobrindt, U., Tóth I.: **Sequence variability of P2-like phage genomes carrying the cytolethal distending toxin V operon in *Escherichia coli* O157**, *Appl. Environ. Microbiol.*, 79. 4958-4964, 2013b.
- Sváb D., Horváth B., Szűcs A., Maróti G., Tóth I.: **Draft genome sequence of an *Escherichia coli* O157:H43 strain isolated from cattle**, *Genome Announc.*, 1. e00263-13, 2013c.
- Sváb D., Tóth I.: **Allelic types of long polar fimbriae in bovine and human *Escherichia coli* O157 strains**, *Acta Vet. Hung.*, 60. 1-15, 2012.
- Tapping, R.I., Akashi, S., Miyake, K., Godowski, P.J., Tobias, P.S.: **Toll-like receptor 4, but not toll-like receptor 2, is a signaling receptor for *Escherichia* and *Salmonella* lipopolysaccharides**, *J. Immunol.*, 165. 5780-5787, 2000.
- Tilden, J., Young, W., McNamara, A.M., Custer, C., Boesel, B., Lambert-Fair, M.A., Majkowski, J., Vugia, D., Werner, S.B., Hollingsworth, J., Morris, J.G.: **A new route of transmission for *Escherichia coli*: infection by dry fermented salami**, *Am. J. Public Health*, 86. 1142-1145, 1996.
- Toma, C., Higa, N., Iyoda, S., Rivas, M., Iwanaga, M.: **The long polar fimbriae genes identified in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* are present in other diarrheagenic *E. coli* and in the standard *E. coli* collection of reference (ECOR) strains**, *Res. Microbiol.*, 157. 153-161, 2006.
- Toma, C., Martínez Espinosa, E., Song, T., Miliwebsky, E., Chinen, I., Iyoda, S., Iwanaga, M., Rivas, M.: **Distribution of putative adhesins in different seropathotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli***, *J. Clin. Microbiol.*, 42. 4937-4946, 2004.
- Torres, A.G., Blanco, M., Valenzuela, P., Slater, T.M., Patel, S.D., Dahbi, G., López, C., Barriga, X.F., Blanco, J.E., Gomes, T.A.T., Vidal, R., Blanco, J.: **Genes related to long polar fimbriae of pathogenic *Escherichia coli* strains as reliable markers to identify virulent isolates**, *J. Clin. Microbiol.*, 47. 2442-2451, 2009.

- Torres, A.G., Giron, J.A., Perna, N.T., Burland, V., Blattner, F.R., Avelino-Flores, F., Kaper, J.B.: **Identification and characterization of *lpfABCC'DE*, a fimbrial operon of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7**, *Infect. Immun.*, 70. 5416-5427, 2002.
- Torres, A.G., Kanack, K.J., Tutt, C.B., Popov, V., Kaper, J.B.: **Characterization of the second long polar (LP) fimbriae of *Escherichia coli* O157:H7 and distribution of LP fimbriae in other pathogenic *E. coli* strains**, *FEMS Microbiol. Lett.*, 238. 333-344, 2004.
- Torres, A.G., López-Sánchez, G.N., Milflores-Flores, L., Patel, S.D., Rojas-López, M., Martínez de la Peña, C.F., Arenas-Hernández, M.M., Martínez-Laguna, Y.: **Ler and H-NS, regulators controlling expression of the long polar fimbriae of *Escherichia coli* O157:H7**, *J. Bacteriol.*, 189. 5916-5928, 2007a.
- Torres, A.G., Milflores-Flores, L., Garcia-Gallegos, J.G., Patel, S.D., Best, A., La Ragione, R.M., Martinez-Laguna, Y., Woodward, M.J.: **Environmental regulation and colonization attributes of the long polar fimbriae (Lpf) of *Escherichia coli* O157:H7**, *Int. J. Med. Microbiol.*, 297. 177-185, 2007b.
- Torres, A.G., Slater, T.M., Patel, S.D., Popov, V.L., Arenas-Hernández, M.M.: **Contribution of Ler- and H-NS-regulated long polar fimbriae of *Escherichia coli* O157:H7 during binding to tissue-cultured cells**, *Infect. Immun.*, 76. 5062-5071, 2008.
- Touchon, M., Hoede, C., Tenailon, O., Barbe, V., Baeriswyl, S., Bidet, P., Bingen, E., Bonacorsi, S., Bouchier, C., Bouvet, O., Calteau, A., Chiapello, H., Clermont, O., Cruveiller, S., Danchin, A., Diard, M., Dossat, C., Karoui, M.E., Frapy, E., Garry, L., Ghigo, J.M., Gilles, A.M., Johnson, J., Le Bouguéneq, C., Lescat, M., Mangenot, S., Martinez-Jéhanne, V., Matic, I., Nassif, X., Oztas, S., Petit, M.A., Pichon, C., Rouy, Z., Ruf, C.S., Schneider, D., Turret, J., Vacherie, B., Vallenet, D., Médigue, C., Rocha, E.P.C., Denamur, E.: **Organised genome dynamics in the *Escherichia coli* species results in highly diverse adaptive paths**, *PLoS Genet.*, 5. e1000344, 2009.
- Tóth I., Barrett, T.J., Cohen, M.L., Rumschlag, H.S., Green, J.H., Wachsmuth, I.K.: **Enzyme-linked immunosorbent assay for products of the 60-megadalton plasmid of *Escherichia coli* serotype O157:H7**, *J. Clin. Microbiol.*, 29. 1016-1019, 1991.
- Tóth I., Dobrindt, U., Koscsó B., Kósa A., Herpay M., Nagy B.: **Genetic and phylogenetic analysis of avian extraintestinal and intestinal *Escherichia coli***, *Acta. Microbiol. Immunol. Hung.*, 59. 393–409, 2012.
- Tóth I., Héroult, F., Beutin, L., Oswald, E.: **Production of cytolethal distending toxins by pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from human and animal sources: establishment of the existence of a new *cdt* variant (type IV)**, *J. Clin. Microbiol.*, 41. 4285-4291, 2003.
- Tóth I., Nougayrède, J., Dobrindt, U., Ledger, T.N., Boury, M., Morabito, S., Fujiwara, T., Sugai, M., Hacker, J., Oswald, E.: **Cytolethal distending toxin type I and type IV genes**

- are framed with lambdoid prophage genes in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*, *Infect. Immun.*, 77. 492-500, 2009a.
- Tóth I., Oswald, E., Mainil, J.G., Awad-Masalmeh, M., Nagy B.: **Characterization of intestinal *cnf1+* *Escherichia coli* from weaned pigs**, *Int. J. Med. Microbiol.*, 290. 539–542, 2000.
- Tóth I., Schmidt, H., Kardos G., Lancz Z., Creuzburg K., Damjanova, I., Pászti J., Beutin, L., Nagy B.: **Virulence genes and molecular typing of different groups of *Escherichia coli* O157 strains in cattle**, *Appl. Environ. Microbiol.*, 75. 6282-6291, 2009b.
- Van Bost, S., Bâbe, M.H., Jacquemin, E., Mainil, J.: **Characteristics of necrotoxicogenic *Escherichia coli* isolated from septicemic and diarrheic calves between 1958 and 1970**, *Vet. Microbiol.*, 82. 311-320, 2001.
- Weiser, A.A., Gross, S., Schielke, A., Wigger, J.F., Ernert, A., Adolphs, J., Fetsch, A., Müller-Graf, C., Käsbohrer, A., Mosbach-Schulz, O., Appel, B., Greiner, M.: **Trace-back and trace-forward tools developed *ad hoc* and used during the STEC O104:H4 outbreak 2011 in Germany and generic concepts for future outbreak situations**, *Foodborne Pathog. Dis.*, 10. 263-269, 2013.
- Wirth, T., Falush, D., Lan, R., Colles, F., Mensa, P., Wieler, L.H., Karch, H., Reeves, P.R., Maiden, M.C.J., Ochman, H., Achtman, M.: **Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective**, *Mol. Microbiol.*, 60. 1136-1151, 2006.
- Wising, C., Mölne, L., Jonsson, I., Ahlman, K., Lagergård, T.: **The cytolethal distending toxin of *Haemophilus ducreyi* aggravates dermal lesions in a rabbit model of chancroid**, *Microbes Infect.*, 7. 867-874, 2005.
- Woodcock, D.M., Crowther, P.J., Doherty J., Jefferson S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S.S., Michael, M.Z., Graham, M.W.: **Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants**, *Nucleic Acid Res.*, 17. 3469-3478, 1989.
- Wu, Y., Hinenoya, A., Taguchi, T., Nagita, A., Shima, K., Tsukamoto, T., Sugimoto, N., Asakura, M., Yamasaki, S.: **Distribution of virulence genes related to adhesins and toxins in Shiga-toxin producing *Escherichia coli* strains isolated from healthy cattle and diarrheal patients in Japan**, *J. Vet. Med. Sci.*, 72. 589-597, 2010.
- Young, R.S., Fortney, K.R., Gelfanova, V., Phillips, C.L., Katz, B.P., Hood, A.F., Latimer, J.L., Munson, R.S.J., Hansen, E.J., Spinola, S.M.: **Expression of cytolethal distending toxin and hemolysin is not required for pustule formation by *Haemophilus ducreyi* in human volunteers**, *Infect. Immun.*, 69. 1938-1942, 2001.
- Zhou, S., Shanmugam, K.T., Yomano, L.P., Grabar, T.B., Ingram, O.B.: **Fermentation of 12% (w/v) glucose to 1.2 M lactate by *Escherichia coli* strain SZ194 using mineral salts medium**. *Biotechnol. Lett.*, 28. 663-670, 2006.

9. A doktori kutatás eredményeinek közzélései

9.1. Lektorált tudományos folyóiratokban megjelent közlemények

Sváb D., Galli, L., Horváth B., Maróti G., Dobrindt, U., Torres, A.G., Rivas, M., Tóth I.: **The long polar fimbriae operon and its flanking regions in bovine *Escherichia coli* O157:H43 and STEC O136:H12 strains**, Pathog. Dis., 68. 1-7, 2013. (IF: 2,684)

Sváb D., Horváth B., Maróti G., Dobrindt, U., Tóth I.: **Sequence variability of P2-like phage genomes carrying the cytolethal distending toxin V operon in *Escherichia coli* O157**, Appl. Environ. Microbiol., 79. 4958-4964, 2013. (IF: 3,678)

Sváb D., Horváth B., Szűcs A., Maróti G., Tóth I.: **Draft genome sequence of an *Escherichia coli* O157:H43 strain isolated from cattle**, Genome Announc., 1. e00263-13, 2013.

Sváb D., Tóth I.: **Allelic types of long polar fimbriae in bovine and human *Escherichia coli* O157 strains**, Acta Vet. Hung., 60. 1-15, 2012. (IF: 1,173)

Sváb D., Tóth I.: **Citoletális duzzasztó toxinok állatra és emberre patogén *Escherichia coli*ban**, Magyar Állatorv. Lapja, 135. 367-375, 2013. (IF: 0,146)

9.2. Könyvfejezet

TÓTH I., SVÁB D.: Cell Cycle Modulating Toxins Produced by *Escherichia coli*. In: *Pathogenic Escherichia coli: Molecular and Cellular Microbiology*. Szerk.: MORABITO, S. Norwich, Nagy-Britannia: Caister Academic Press, 2014. p. 117-138 (nyomdában).

9.3. Konferenciaközlemények

Sváb D., Tóth I.: **Genotyping of long polar fimbriae in bovine *Escherichia coli* O157 strains**, Abstracts of the 2nd Central European Forum for Microbiology, October 7-9, 2009, Keszthely, Hungary. Acta Microbiol. Immunol., 56 (Suppl. 2). 245, 2009.

Sváb D., Tóth I.: **Cytolethal distending toxin V (*cdt-V*) operon is flanked by P2-like phage elements in bovine *Escherichia coli* O157**, Abstracts of the 16th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, July 20-22, 2011, Budapest, Hungary. Acta Microbiol. Immunol., 58 (Suppl. 1). 218, 2011.

Sváb D., Horváth B., Maróti G., Tóth I.: **Cloning and sequencing cytolethal distending toxin V (*cdt-V*) operon and its flanking regions in an atypical bovine *Escherichia coli* O157:H43 strain**, Zoonoses and Public Health, 59 (Issue Supplement s1). 46, 2012.

Sváb D, Horváth B, Szűcs A, Maróti G, Tóth I. 2013. **Draft genome sequence of a bovine *Escherichia coli* O157:H43 strain representing a novel genotype**, Abstracts of the 4th Central European Forum for Microbiology, October 16-18, Keszthely, Hungary. Acta Microbiol Immunol Hung. 60 (Suppl. 1). 235, 2013.

10. A doktori kutatás témájához közvetlenül nem kapcsolódó eredmények közlései

Palatinszky M., Nikolausz M., Sváb D., Márialigeti K.: **Preferential ligation during TA-cloning of multitemplate PCR products – a factor causing bias in a microbial community structure analysis**, J. Microb. Methods, 85. 131-136, 2011. (IF: 2,086)

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, **Tóth Istvánnak**, aki tudásával, tapasztalatával, valamint folyamatos támogatásával, biztatásával és rengeteg türelemmel segített munkám és az értekezés elkészítése során.

Köszönet illeti **Nagy Béla** akadémikus urat is, aki kezdettől fogva támogatott és biztatott, és akitől munkám során rengeteg hasznos tanácsot kaptam.

Köszönöm a témacsoport valamennyi tagjának, különösen **Puruczki Mártának** és **Szmolka Amának** a számtalan esetben nekem nyújtott szakmai és technikai segítséget, melyek ugyancsak nélkülözhetetlenek voltak értekezésem elkészítéséhez.

Köszönet illeti az MTA ATK Állatorvos-tudományi Intézetének valamennyi munkatársát, akiktől az elmúlt évek során szintén sok esetben kaptam szakmai vagy technikai segítséget.

Köszönöm összes társszerzőmnek a kísérletekhez és kéziratok megírásához történő hozzájárulását, különösen **Maróti Gergelynek** és **Horváth Baláznak**, akiknek a szekvencia-meghatározási munkákban és az azokat követő bioinformatikai elemzésben meghatározó része volt.

Végül meg szeretném köszönni családomnak is az elmúlt években végig kitartó támogatást és biztatást.

Munkáink anyagi fedezetét jelentős részben az OTKA K 81252 számú pályázata, kisebb részben az ERC AdG "SYMBIOTICS" című pályázata jelentették.