

Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

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

PhD értekezés tézisei

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

Bevezetés és célkitűzések

„Szarvasmarha eredetű atípusos *Escherichia coli* O157 törzsek virulencia faktorainak genetikai háttere” c. értekezésem előzményeként csoportunk egy korábbi munkája során *E. coli* O157 törzseket izolált és jellemzett szarvasmarhából, ami többnyire rezervoárja ezen jelentős humán kórokozónak. 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. Az atípusos törzsek többsége kizárólagos virulenciafaktoroként termelte a citoletális duzzasztó toxin V-ös típusát (CDT-V), valamint hordozta a long polar fimbria (Lpf) nevű adhéziós faktor 2-es típusát (Lpf2) kódoló operont is (*lpf2*).

A CDT az eukarióta sejtciklust gátló toxinok, a ciklomodulinok közé tartozik, különböző típusait számos Gram-negatív emberi és állati kórokozó termeli. *E. coli*-ban öt genetikai típusát különböztetik el (CDT-I-V), a CDT-V-öt jellemzően EHEC és patotípusra nézve nem besorolható törzsek termelik. A toxint kódoló operon (*cdt-V*) környezetében EHEC törzsek esetében korábban P2-szerű fágokból származó szekvenciákat azonosítottak, de igen kevés szekvencia-adat állt rendelkezésre e törzsekből.

Az Lpf számos *E. coli* törzsben jelenlevő, sejt felszíni, hajszálszerű struktúra, melynek kódoló operonjain belül két fő típust (*lpf1* és *lpf2*) és azoknak további öt, illetve három allélikus típusát különböztetik el. Korábbi irodalmi adatok szerint az *lpf2-1* típus igen elterjedt sok különböző szero- és patotípust képviselő patogén és kommenzalista *E. coli* törzs körében és valószínűleg adhéziós funkcióval bír. Utóbbi különösen fontossá teheti olyan törzsek esetében, melyeknek más adhezinjéről nem tudunk.

A fentebb említett atípusos O157 törzsek alkalmat adtak e két virulenciafaktor genetikai jellemzőinek részletes megismerésére, valamint lehetőség nyílt annak megvizsgálására is, hogy milyen filogenetikai és evolúciós viszonyban állhatnak e törzsek a szerocsoport típusosnak mondható, EHEC és EPEC patotípusú tagjaival. 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.

Anyagok és módszerek

Baktériumtörzsek

Összesen 97, részben emberi megbetegedésekből (n=54), részben egészséges szarvasmarhából (n=43) származó *E. coli* O157 törzset, valamint az ECOR (*E. coli* Reference Collection) gyűjtemény 72 tagját vizsgáltuk meg *lpf* gének jelenlétére. Az ECOR gyűjteményen kívüli törzsek három patotípusba voltak sorolhatók: EHEC (n=64), EPEC (n=24), és a sem *stx*-et, sem *eae* gént nem hordozó atípusos törzsek (n=9). Az EHEC és EPEC törzsek az O157:H7 és O157:NM típusokat egyaránt képviselték, az atípusos törzsek az O157:H43 (n=3), O157:H37, O157:H12 (n=3), O157:H9 és O157:NM szerotípusokba voltak sorolhatók.

Fenotípusos módszerek

Négy törzs esetében szükség volt a szerotípus meghatározására, ezt O157 antigén-specifikus latex agglutinációs teszttel (Oxoid) és H7 antigén elleni hiperimmun savóval végeztük.

Genotipizálás

Irodalmi primerekkel végzett PCR reakciókkal vizsgáltuk a törzsek *lpf* típusait, valamint az egyes *lpf* struktúrgének jelenlétét. Ugyancsak irodalmi primerek felhasználásával vizsgáltuk a Shiga-toxinokat kódoló *stx1* és *stx2*, az intimint kódoló *eae* gének, valamint a hőstabil és hőlabilis enterotoxint kódoló gének jelenlétét is. A törzsek filogenetikai típusát a Clermont és munkatársai által kidolgozott triplex PCR rendszer segítségével határoztuk meg.

Az *lpf2-1* és a *cdt-V* operonok jellegzetes határoló régióinak jelenlétét saját tervezésű primerekkel végzett PCR reakciók segítségével határoztuk meg. E monitorozást az *lpf2-1* határoló régiói esetében a típustörzsön kívül összesen 20 *lpf2-1* hordozó és egy *lpf*-negatív törzs körében, a *cdt-V* esetében tizenhét törzs körében végeztük, utóbbiak közül hét termelt CDT-V-öt.

Kozmid klónkönyvtár készítése

Az *E. coli* T22 jelzésű, O157:H43 szerotípusú, a CDT-V-öt termelő és az *lpf2-1* operont hordozó atípusos törzs genomjából a pWEB TNC Cosmid Cloning Kit (Epicentre) segítségével egy 1000 klónból álló kozmid klónkönyvtárat készítettünk. A *cdt-V*-öt és az *lpf2-1*-et hordozó kozmid klónokat PCR reakciók segítségével azonosítottuk.

Szekvencia-meghatározás

A T22 törzs genomjából készült, *cdt-V*-öt és *lpf2-1*-et hordozó kozmidok nukleotid-szekvenciáját, valamint a T22 törzs teljes genomi szekvenciáját új-generációs szekvencia-meghatározási módszerekkel, a SOLiD 4, Ion Torrent PGM és a 454 Titanium platformokon, valamint esetenként kiegészítés és pontosítás céljából a Sanger-féle dideoxinukleotid módszer felhasználásával határoztuk meg.

Bioinformatikai módszerek

A kapott szekvenciaadatokat a CLC Genomic Workbench 6.0 program segítségével állítottuk össze, a vizsgált szakaszok és a genom annotációja az NCBI Prokaryotic Genomes Automatic Annotation Pipeline felhasználásával történt. A T22 törzs virtuális MLST tipizálását a University College Cork által fenntartott PubMLST adatbázis felhasználásával végeztük. A T22 törzs teljes genom szekvenciája esetében *E. coli* patotípusok jellegzetes virulenciagénjeinek és azok integrációs helyeinek jelenlétét is ellenőriztük.

Fágindukciós kísérletek

cdt-V operont hordozó P2-szerű profág szekvenciákat tartalmazó atípusos (n=5) és EHEC (n=3) O157 törzsekkel végeztünk fágindukciós kísérleteket. Indukáló ágensként mitomicin-C-t, norfloxacin-t és UV-fényt használtunk, a propagáló törzsek az *E. coli* K-12 C600 és ER2738 jelzésű törzsek, valamint a *Shigella sonnei* 866-F jelzésű törzse voltak.

Génexpressziós vizsgálat

Reverz transzkripció PCR-rel ellenőriztük az *lpfA* gén expresszióját a T22 törzs esetében.

Adhéziós kísérletek

Az Lpf2 adhéziós funkciójának felderítése céljából a T22 törzs adhézióját primer szarvasmarha vese- és here sejtenyészeten vizsgáltuk.

Eredmények

lpf tipizálás

A 97 vizsgált O157 szerocsoportú törzs közül 95 hordozta legalább az egyik típusú *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 az *lpf1-3*, *lpf2*-ből az *lpf2-2* allélváltozatot hordozták. A hét atípusos *lpf*-pozitív törzs csak az *lpf2-1* változatot hordozta. Az ECOR törzseknek is meghatároztuk az *lpf* alléltípusait, közülük 26 bizonyult *lpf*-pozitívnak, hét törzs csak *lpf1*-et tartalmazott, tizenegy törzs csak *lpf2*-t, és nyolc olyan törzs volt, mely mindkét operont hordozta. E pozitív törzsek közt négy olyan volt, melyeket korábbi vizsgálatokban *lpf*-negatívnak találtak, a negatívak közül pedig kilenc korábbi vizsgálatokban pozitívnak bizonyult.

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

Az *lpf* lókuszt klónoztuk

Kozmid klónkönyvtár segítségével meghatároztuk a nukleotid szekvenciáját a T22 törzs 15,3 kb hosszúságú genomi szakaszának, mely az *lpf2-1* operont is tartalmazta. Meghatároztuk hat további *E. coli* O157 atípusos törzs *lpf2-1* operonjának szekvenciáját is. 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 *lpf2-1* operon határoló régióinak jelenlétére vizsgált 20 *lpf2-1*-pozitív törzsből tizenöt, köztük egy kivétellel az atípusos O157 szerocsoportba tartozók is az összes vizsgált szakaszra pozitívnak bizonyultak.

Az *lpfA* gént célzó reverz transzkripció PCR-reakció igazolta, hogy az operon a struktúrgénje expresszállódik a T22 törzs esetében.

A szarvasmarha veséből és heréből nyert primer sejt kultúrák esetében nem volt megfigyelhető specifikus adhézió a T22 törzs esetében.

A *cdt-V* operon és határoló régióinak klónoztuk

A *cdt-V* operont egy 31,2 kb hosszúságú, a kromoszómába épült P2-szerű profág hordozza. A profág génjei 94-100% közti egyezést mutatnak a GenBankban található más P2-szerű profágok génjeivel, viszont két inszercióval is bír: az egyik a *cdt-V* operon, melynek GC aránya (41%) jelentősen eltér a profág átlagos GC arányától (52%), a másik egy enterotoxikus *E. coli* törzs ismeretlen típusú fág farok génjének a töredékével mutat egyezést. A hús, PCR-rel vizsgált jellegzetes P2-szerű génszakasz közül a T22 törzsen kívüli CDT-V termelő atípusos O157 törzsek (n=4) pozitívak voltak 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.

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

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 három kontigból áll,

összesen 90 gént tartalmaz, ebből 89 fehérjét kódol, egy tRNS-t. A genom GC aránya 50,8%.

A hét háztartási gén szekvenciáján alapuló MLST tipizálás azt mutatta, hogy a T22 törzs a 155-ös szekvenciatípusba (ST155) tartozik.

A T22 törzs a szekvenciadatok alapján nem hordozza sem az EHEC (*stx*, *eae*), sem az EPEC (*eae*, *bfp*), sem az ETEC (*st*, *lt*), sem az EAEC (*aggR*) fő virulenciagénjeit sem a kromoszómán, sem a plazmidon.

GenBank elérési számok

A munkánk során meghatározott szekvenciákat az alábbi elérési számok alatt helyeztük el a GenBank adatbázisban:

E. coli O157:H43 T22 törzs *lpf2-1* operonja és annak környezete: **AHZD01000104**

E. coli O157:NM B47 törzs *lpf2-1* operonja: **KC207119**

E. coli O157:H12 B54 törzs *lpf2-1* operonja: **KC207120**

E. coli O157:H43 T16 törzs *lpf2-1* operonja: **KC207121**

E. coli O157:H9 T34 törzs *lpf2-1* operonja: **KC207122**

E. coli O157:H37 T49 törzs *lpf2-1* operonja: **KC207123**

E. coli O157:H43 T50 törzs *lpf2-1* operonja: **KC207124**

E. coli O157:H43 T22 törzs által hordozott P2-szerű profág: **KC618326.1**

E. coli O157:H43 T22 törzs teljes draft genomja: **AHZD00000000.2**

Megbeszélés

Az általunk vizsgált *E. coli* O157 szerocsoportba tartozó törzsek filogenetikai tipizálása és *lpf* operonjaik genotipizálása egyértelműen megmutatta, hogy e törzseken belül létezik egy vagy több, atípusos virulenciafaktor készlettel rendelkező leszármazási vonal, mely elkülönül ugyanezen szerocsoport EHEC és EPEC törzseitől. Megerősítettük azon irodalmi adatokat, melyek szerint összefüggés van a törzsek patotípusa és az általuk hordozott *lpf* allélikus típus(ok) között. Az ECOR törzsek esetében az *lpf*-hordozásban a korábbi vizsgálatokhoz

képezt tapasztalható eltérések arra utalnak, hogy az *lpf*-nek további, eddig ismeretlen allélikus típusai létezhetnek.

Az *lpf2-1* operon szekvenciája igen konzervatív az atípusos O157 törzsek körében, és egy hasonlóan konzervatív felépítésű genomi régióban alkot egy PAI-t (patogenitási sziget), 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 horizontális gén transzfer (HGT) révén terjedtek el a különböző patogén és kommenzalista *E. coli* törzsek között. Mindenképpen további *in vitro* és *in vivo* kísérletek szükségesek az *Lpf2*-nek az atípusos O157 törzsek adhéziójában játszott esetleges szerepének tisztázásához.

A korábbi irodalmi adatokat kibővítve igazoltuk, hogy valóban egy P2-szerű profág hordozza a *cdt-V* operont. A profág gének különböző CDT-termelő és CDT-negatív törzsek körében történő monitorozása alapján megállapítható, hogy e *cdt-V* hordozó profágoknak legalább három különböző leszármazási vonala létezik. Az egyik a T22 törzsben találhatóval azonos, vagy ahhoz nagyon hasonló, melyet az atípusos O157 törzsek hordoznak. Az O157:NM EHEC törzsek által hordozott vonal több gén tekintetében különbözik az előző leszármazási vonal génjeitől, és integrációs helye is más. Harmadik leszármazási vonalnak tekinthető egy korábban 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 gazdatörzsekhez történő adaptációja vezethetett a körükben tapasztalható szekvencia-heterogenitáshoz, és legalábbis az első két esetben a fágok temperálódásához.

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. A szekvenciaadatok szerint az eddig ismert O157 törzsekhez képest új genotípust képviselő, valóban atípusosnak mondható törzsről van szó. Genomjában az ismert fő virulenciagének integrációs helyei érintetlenek, ez felveti annak lehetőségét, hogy a törzs alkalmas lehet további virulenciagének felvételére. Az ilyen jellegű atípusos, Stx- és intimin-negatív *E. coli* O157 törzsek tehát mindenképpen figyelmet érdemelnek, hiszen recipiensei lehetnek számos további virulenciafaktoroknak, hozzájárulhatnak mind patogén, mind kommenzalista *E. coli* törzsek evolúciójához, és a törzsek zoonotikus jelentősége sem zárható ki. E törzsek vizsgálata segíthet megérteni az O157 szerocsoport genetikai változékonyságának hátterében álló mechanizmusokat, és pontosabban meghatározni a különböző virulenciafaktor készlettel rendelkező törzsek zoonotikus potenciálját.

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 hús génből legalább tizenhétet hordoztak, addig az EHEC törzsek 15-16 közötti számút, a hiányzó gének közt volt a P2-szerű profágok 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.

A doktori kutatás eredményeinek közlései

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)

Könyvfejezet

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

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.

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.