

***Campylobacter jejuni* patogenitásában résztvevő virulencia faktorok és a szegfűszeg illóolaj *Campylobacter*-ellenes hatásmechanizmusának vizsgálata**

Ph.D. értekezés tézisei

Kovács Judit Klára

Témavezető: Dr. Schneider György

Programvezetők: Professzor Dr. Emőd Levente, Dr. Kerényi Monika

A Doktori Iskola vezetője: Professzor Dr. Szekeres Júlia



Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézet

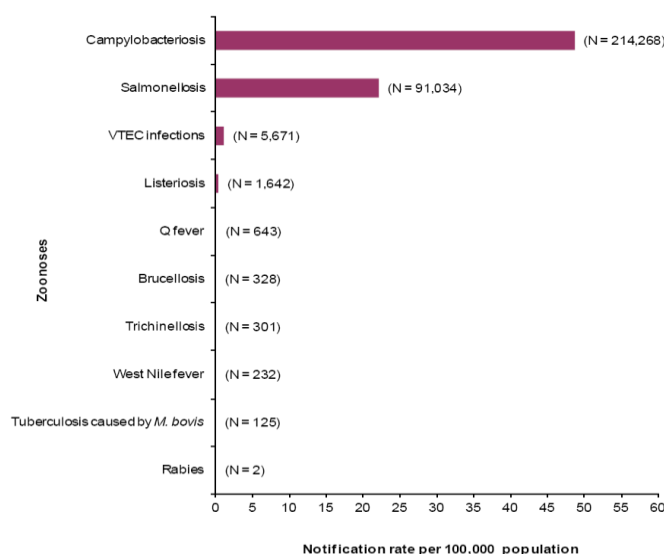
Pécs

2014

I. BEVEZETÉS

I.1. A campylobacterek

A világon előforduló zoonotikus bakteriális eredetű ételfertőzések legnagyobb hányadáért a campylobacterek felelősek. A nemzetség tagjai közt találhatóak ugyan kommenzális fajok, de többségük a humán és az állati bélrendszert fertőző patogén. Közülük is messzemenően legjelentősebb a *Campylobacter jejuni*. A “Centers for Disease Control and Prevention” (CDC) adatai szerint a 2006-2008 közötti időszakban a campylobacter fertőzések száma 14%-kal emelkedett. A 2008-2012 közötti periódusban több Európai Unió (EU) országban, köztük Magyarországon is, hasonló növekedési arányt észleltek (**1. ábra**).



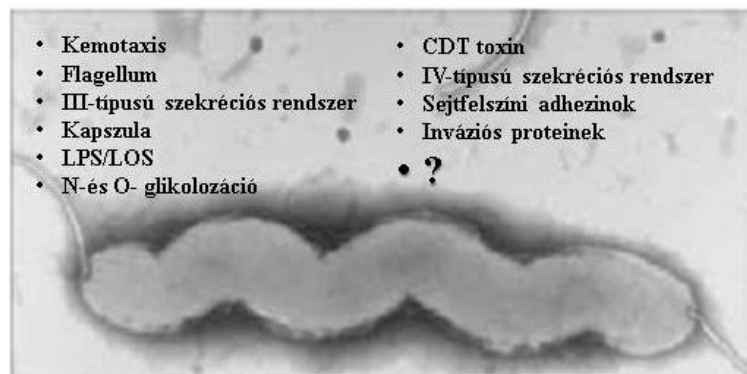
1. ábra A bejelentett zoonotikus esetek előfordulási aránya az EU-ban, EU/EFTA 2012.

VTEC: verotoxin termelő *Escherichia coli*

Mivel a campylobacter fajok a természetben széles körben előfordulnak, és a legtöbb eset sporadikus, a fertőzések forrásainak felderítése nagy nehézségekkel jár. A filogenotipizáló módszereken alapuló epidemiológiai vizsgálatok rendkívül fontosak az esetek nyomon követésében és ellenőrzésében. A fertőzések elsődleges forrása a nem megfelelően hőkezelt baromfiús, de a pasztörizetlen tej és a kezeletlen környezeti vízforrások is jelentős rizikófaktort jelentenek. A fertőzés változatos klinikai formákban jelentkezhet: a tünetmentest hordozástól az enyhe hasmenésen keresztül a súlyos véres hasmenésig. A fertőzés szövődményeként ritkán idegrendszeri tünetek is jelentkezhetnek (Miller-Fisher vagy Guillain-Barré szindróma). A legtöbb esetben a fertőzés különösebb kezelést nem igényel, de elhúzódó és súlyos esetekben az antimikrobiális kezelés elengedhetetlen. Napjainkban a fertőzés kezelésére leggyakrabban

alkalmazott antibiotikumok a makrolidok, habár az elmúlt évtizedben a velük és más szerekkel szemben kialakult egyre terjedő rezisztencia felveti új alternatív antimikrobiális szerek alkalmazásának kérdését, mind a terápiában mind pedig a megelőzésben.

A *C. jejuni* fertőzések patomechanizmusa még nem minden részletében feltárt folyamat. Mindamellett, hogy számos -más enterális korokozó esetében is jól ismert- virulencia faktort és mechanizmust (motilitás, kemotaxis, adhézió, invázió, intracelluláris túlélés és toxintermelés) azonosítottak, az utóbbi időben derült fény a baktérium egyedi, a virulenciát és túlélést is befolyásoló, sajátosságaira (N-, és O-, glikolizáció, inváziós proteinek, adhezinek, stb.). **(2. ábra)**. Még kevésbé ismert a campylobacteriosis pontos molekuláris háttere, valamint az, hogy milyen mértékben játszanak szerepet bizonyos gazda vagy bakteriális faktorok az egyes klinikai esetek (súlyosságának) kialakulásában.



2. ábra A *Campylobacter jejuni* virulencia faktorai

Tovább nehezíti a problémát, hogy a *C. jejuni* genomja számos hipervariábilis régiót tartalmaz, mint például a tok és a lipooligoszacharid/lipopoliszacharid (LOS/LPS) struktúrák kódolásáért felelős génszakaszok.

A *C. jejuni* LOS/LPS struktúrája

A *C. jejuni* egyik fő karakterisztikus tulajdonsága, hogy különböző sejtfelszíni glikokonjugátumok képzésére képes, úgymint a glikoproteinek és a glikolipidek, amelyeknek fontos szerepet tulajdonítanak a túlélési stratégiákban, a patomechanizmusban, továbbá, a szerotípus kialakításban. A *C. jejuni* sejtfelszíni cukor komponensek összetétele és a patomechanizmusban betöltött szerepe még kérdéses. Az sem teljesen tisztázott, hogy hasonlóan más bélfertőzést okozó Gram-negatív baktériumokhoz a *C. jejuni* rendelkezik-e nagy molekulatömegű (HMW) LPS-szerű struktúrákkal. A legfőbb probléma az, hogy a tradicionális LPS izoláló ezüsfestéses módszer, amely alkalmas a

Salmonella, *E. coli*, *Shigella*, stb. e struktúráinak kimutatására, nem alkalmas a *Campylobacter* spp. homológ sejtfelszíni struktúráinak izolálására.

I.2. Esszenciális olajok

Az esszenciális olajok (EOk) olyan másodlagos metabolitok, amelyek antimikrobiális hatásuk révén fontos szerepet játszanak a növények védelmében. Különböző bizonyított, illetve feltételezett antimikrobiális hatásmechanizmussal rendelkezhetnek. Hidrofób tulajdonságuknak köszönhetően a bakteriális sejtmembrán lipid rétegének megbomlását okozhatják, amely által a membrán depolimerizálttá és permeábilisabbá válhat. A membrán potenciál csökkenésével, a membránon történő ionáramlás, és az ebből következő energianyerő folyamatok is zavart szenvednek. Bizonyos illóolaj komponensek a sejt falban található transzportfehérjék funkciójának gátlásával képesek megakadályozni egyes esszenciális molekulák bejutását a sejtbe. A membrán fluiditását is meg tudják változtatni a telítetlen zsírsavak arányának csökkentésével, továbbá képesek befolyásolni az ún. quorum sensing (QS) folyamatát. Az illóolajok szubletális koncentrációban való vizsgálata a legalkalmasabb arra, hogy felderítsük az antibakteriális hatásuk hátterében álló molekuláris változásokat.

A **szegfűszeg illóolaj** az egyik legerősebb antibakteriális hatással bíró illóolaj. Fő komponensének az eugenolnak tulajdonítható az illóolaj erős biológiai és antimikrobiális hatása. Az eugenol nem specifikusan permeabilizálja a sejtmembránt, ezzel indukálva a kálium-ion és az ATP kiáramlását a sejtől. Továbbá, a sejtmembrán zsírsavösszetételét is képes megváltoztatni. Feltételezések szerint az eugenol egyes fehérjékhez kapcsolódva idézi elő azok funkcióváltozásait.

II. CÉLKITŰZÉSEK

Vizsgálataink 2006-ra nyúlnak vissza, amikor az Állami Népegészségügyi és Tisztiorvosi Szolgálat Dél-Dunántúli Regionális Intézetének Mikrobiológiai Osztályán hasmenéses betegek székletéből izolált közel 400 *Campylobacter jejuni* törzsből 190-et őriztek meg törzsgyűjteményünk számára. Az izolátumok olyan kórházi betegektől származtak, amelyek különböző súlyosságú tünetekkel bírtak: az enyhe hasmenéstől a súlyos véres nyákos hasmenésig.

Ph.D. munkám során az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

1. Milyen klonális kapcsolat van a 190 klinikai izolátum között, valamint fenotípusos és genotípusos tesztekkel vizsgálva a törzsek milyen virulencia potenciállal rendelkeznek?
2. Van-e bármilyen kapcsolat a vizsgált törzsek virulencia potenciálja és a klinikai tünetek súlyossága között?

3. Lehetséges-e teljes transzkriptom analízissel új, az eddig még nem teljesen feltárt inváziós folyamatokban szerepet játszó gének azonosítása?
4. Képes-e a szegfűszeg illóolaj antimikrobiális hatása révén kontrollálni a *C. jejuni*-t?
5. Milyen molekuláris és fenotípusos változásokat eredményez a szegfűszeg illóolaj a *C. jejuni* sejten belül és kívül, amely végül a baktérium pusztulásához vezet?
6. Az LPS kimutatási módszerek változtatásával sikerül-e olyan eljárást kidolgozni, amely alkalmas nagy molekulatömegű lipopoliszacharid struktúrák kimutatására a *C. jejuni* törzsek felületén?

III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Az alábbi módszereket alkalmaztuk:

- 190 klinikai izolátum klonális kapcsolatának feltárása (epidemiológiai vizsgálatok):
 - *FlaA*- restrikciós fragment hossz polimorfizmus (*flaA*-RFLP)
 - Pulzáló mezejű gélelektroforézis (PFGE)
- A törzsgyűjtemény virulencia faktor mintázatának jellemzése:
 - Polimeráz láncreakció (PCR)
 - Szilárd fázisú extracelluláris mátrixprotein kötési vizsgálat
 - INT407 sejt adhéziós és inváziós vizsgálat
- Egy nagy virulenciát mutató törzs génexpressziós analízise az invázió során:
 - Teljes transzkriptom analízis (RNA-Seq)
- *C. jejuni* molekuláris és fenotípusos változásainak detektálása szegfűszeg illóolaj hatására:
 - Minimális gátló (MIC) és minimális baktericid (MBC) koncentráció meghatározása
 - Elektroforetikus fehérje mikrochip
 - Kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézis (2D-PAGE)
 - Folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometriás (LC-MS) vizsgálat
 - Valós idejű PCR (RT-PCR) analízis
 - Motilitás vizsgálat
 - Pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálat (SEM)
 - Gázkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometriás (GC-MS) analízis
 - Vékony réteg kromatográfia - direkt bioautográfia (VRK-DB)
- A *C. jejuni* nagy molekulatömegű lipopoliszacharid struktúráinak kimutatására alkalmas módszer kifejlesztése

IV. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

A 190 *C. jejuni* klinikai izolátum klonalitás vizsgálata

PFGE eredmények alapján a tipizálható törzsek mindössze 31%-os homológiával rendelkeznek, amely a törzsek közti nagyfokú diverzitásra utal. A $\geq 90\%$ -os hasonlósági index alapján 69 RFLP és 122 PFGE csoportot különítettünk el. Azonban, 10 törzs (6%) PFGE alapján, egyetlen molekuláris típushoz tartozik, mely csoport RFLP-vel további csoportokra volt osztható. A kapott eredmények alátámasztják az irodalmi adatokat, miszerint a campylobacteriosis esetek többsége sporadikus.

A törzsek virulencia potenciálja

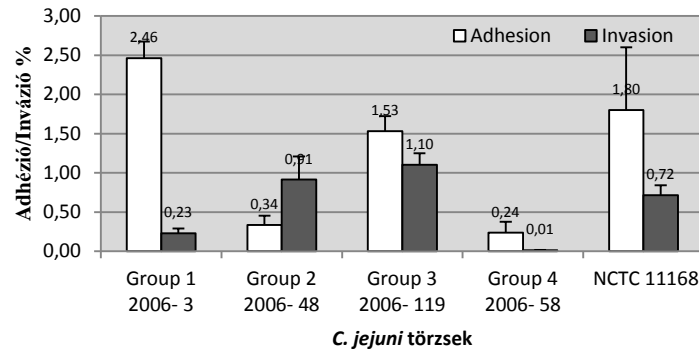
Az alábbi gének (*flaB*, *docA*, *docB*, *cdtB*, *cadF*, *flhB*, *flgB*, *flgE* és *iamA*) széleskörű előfordulása a törzsgyűjteményben jelzi fontos szerepüket, de ezek közül mindössze csak a *cadF*, *cdtB* és *flgE* géneket sikerült kimutatni minden izolátumból. Nem szializált LOS-al rendelkező törzsek ugyanolyan inváziós képességgel rendelkeztek, mint azok a törzsek, amelyek hordozták a LOS szializációjáért felelős *csII/cstIII* géneket (**1. táblázat**).

1. táblázat 190 *C. jejuni* izolátum virulencia génjeinek előfordulása

Virulencia gének	Pozitivitás (%)	Virulencia gének	Pozitivitás (%)
<i>cgtB</i>	63	<i>virB11</i>	3
<i>flaB</i>	96	<i>cadF</i>	100
<i>docA</i>	90	<i>flhB</i>	97
<i>docB</i>	90	<i>flgB</i>	99
<i>docC</i>	51	<i>flgE2</i>	100
<i>cdtB</i>	100	<i>wlaN</i>	44
<i>cstII</i>	35	<i>ciaB</i>	87
<i>csIII</i>	16	<i>iamA</i>	99

A törzsek nagyfokú változatosságot mutattak az extracelluláris mátrix proteinek (ECMPs) kötésének képességében. Az extracelluláris bazális membrán fehérjékhez való kötődés törzsenként eltérő mértéket mutatott. A törzsek a IV-es típusú kollagént kötötték a legnagyobb mértékben, a fibronectinhez és a lamininhez kisebb hányaduk volt képes kötődni.

A törzsek adhéziós és inváziós képessége meglehetősen eltérő értékeket mutatott, és ezek alapján az alábbi csoportokba soroltuk az izolátumokat: (i) magas adhéziós, de alacsony inváziós képességűek (pl. *C. jejuni* 2006-3, 120, és 148), (ii) alacsony adhéziós, de magas inváziós képességűek (pl. *C. jejuni* 2006-48, 64, és 94), (iii) magas adhéziós és inváziós képességűek (pl. *C. jejuni* 2006-18, 101, és 119), és (iv) alacsony adhéziós és inváziós képességűek (pl. *C. jejuni* 2006-16, 58, és 154) (**3. ábra**).



3.ábra A törzsek adhéziós és inváziós képességük alapján létrehozott négy csoportja 1-1 jellemző példával

Nem vonható le egyértelmű következtetés a törzsek filogenetika, fenotípusos és genotípusos tulajdonságai és az általuk okozott esetek tüneteinek súlyossága között. Mindazonáltal három törzs (2006-119, 2006-134, and 2006-165), amelyek súlyos véres hasmenésből származtak, az összes vizsgált virulencia gént hordozták, magas ECMP kötő, továbbá nagy inváziós és adhéziós képességgel rendelkeztek.

Egy nagy virulenciát mutató törzs génexpresszió analízise az invázió során

A nagyfokú virulenciát mutató *C. jejuni* 2006-119 törzs inváziója során izolált cDNS részletes szekvenálását (RNAseq) elvégeztük. Összesen 1668 leolvasási keretet (ORFs) azonosítottunk, amelyek eltérő mértékű transzkripciós szintet mutattak az invázió folyamata során. Az invázió harmadik órájában 963 gén szignifikánsan felülszabályozódott. Közülük 59 membrán fehérje, 39 periplazmatikus és 134 hipotetikus funkcióval rendelkező fehérje expressziós szintjét találtuk megnövekedettnek.

Funkció szerint csoportosítva az alábbi gének mutattak megnövekedett expressziót:

- Transzmembrán funkciók (pl. *secY*, *secE*, *ompA*, és *omp50*)
- Adhézió (pl. *jlpA*, *capA*, *cjaA*, és *flpA*)
- Bakteriális formát meghatározó faktorok (pl. *pbpC*, *rodA*, és *mreB*)
- Sejtfelszíni poliszacharidok (pl. *kpsM*, *kpsE*, és *galE*)
- Invázió (pl. *ciaB*, *htrA* és *cetA*)
- Vaskötés (pl. *ceuBCDE*)
- Szabályozó rendszerek (pl. *dccS* és *racS*)
- Kemotaxis (pl. *cheW* és *cheB*)
- Flagelláris szerkezet (pl. *flhA*, *flhB*, és *motA*)

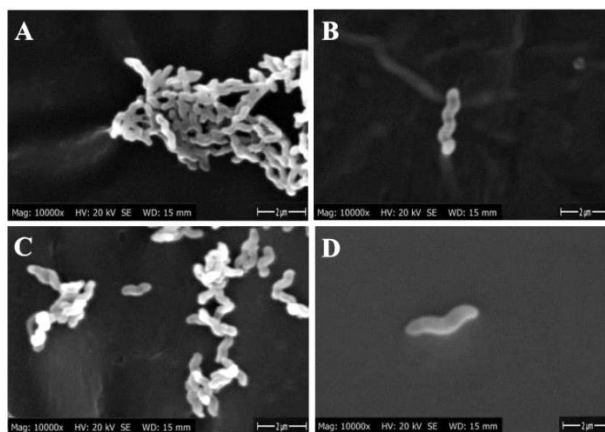
Szegfűszeg illóolaj hatására a *C. jejuni* sejten tapasztalt molekuláris és fenotípusos változások

A szegfűszeg esetében a következő MIC és MBC értékeket kaptuk: 1: 5,000 és 1: 2,500. A szegfűszeg illóolaj egy szubletális koncentrációban (1: 3,000-szeres hígításban) alkalmazva két óra alatt enyhe antimikrobiális hatással bírt, az élő csíraszámot négy *C. jejuni* referencia törzsön kívül további 50 klinikai izolátum esetében is harmadára csökkentve.

Elektroforetikus fehérje mikrochip módszerrel szegfűszeges kezelést követően nagymértékű változásokat detektáltunk a *C. jejuni* NCTC 11168-as törzs fehérje profiljában. Kétdimenziós gélelektroforézis és azt követő LC/MS mérést végeztünk annak érdekében, hogy azonosítani tudjuk azokat a fehérjéket, amelyeket a szegfűszeg illóolaj kezelés a legnagyobb mértékben érintett. A kontroll gélen hat jól meghatározható pontot sikerült azonosítani, amelyek intenzitása alacsonyabb volt a kezelt mintát tartalmazó gélen. Ezek a pontok az alábbi virulenciával kapcsolatos faktornak felelnek meg: (i) *Peb1*, a gazda kolonizációjában fontos faktor, (ii) *Peb4*, egy hőmérsékletfüggő virulencia faktor, és (iii) *HtrA*, egy szerin proteáz, amely szerepet játszik az adhézió és az invázió folyamatában. Továbbá, két fehérjét detektáltunk - egy chaperont és egy elongációs factort (*Tu*), amelyek expressziós intenzitása a kezelt mintát tartalmazó gélen erősebb volt.

RT-PCR analízissel 45 gén expressziós változását vizsgáltuk szegfűszeg illóolaj kezelés hatására. Két, virulenciával összefüggő gén (*galE* és *flhB*) illetve egy erős antigén tulajdonságú külső membrán fehérje (*porA*) expresszió csökkenését sikerült kimutatnunk. Habár, a *katA* gén 51,9-szeres felülexpressziója a szegfűszeg olaj kezelés hatására létrejött erős oxidatív stresszválasz jelenlétét jelzi, mégis további, az oxidatív stresszben szerepet játszó fontos gének (*dps*, *sodB*, és *ahpC*) kifejeződése a kezelés hatására nem változott. Emellett viszont két, az általános stressz válaszban szerepet játszó gén expressziója a kezelés hatására megnőtt.

A szegfűszeg illóolaj sejt-morfológiára gyakorolt lehetséges hatását pásztázó elektronmikroszkóppal vizsgáltuk meg. Két órás kezelés hatására az eredetileg klasszikus spirális morfológiát mutató sejtek (**4-A, B. ábra**) összetöppedtek és kiegyenesedtek (**4-C, D ábra**).



4. ábra Pásztázó elektronmikroszkópos felvételek a kezeletlen (A, B), és szegfűszeg illóolajjal (1: 3,000) kezelt (C, D) *C. jejuni* sejtek.

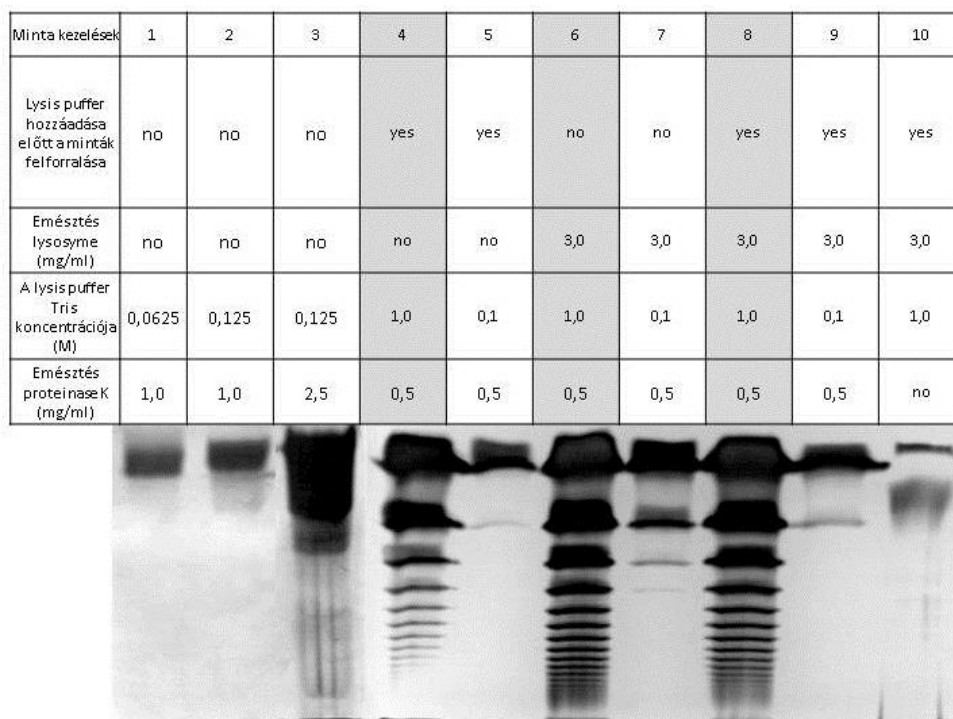
Fenotípusos teszt segítségével kimutattunk, hogy a szubletális dózisban jelenlevő szegfűszeg illóolaj drasztikusan befolyásolja az egyik legkorábban leírt és virulenciában alapvető fontosságú virulencia faktor működését. A kezeletlen sejtek 24 óra mikroaerophil inkubálást követően 3 cm-es rajzást mutattak lágy agar táptalajon. Az 1: 3,000 hígításban alkalmazott szegfűszeg illóolajos kezelést túlélő sejtek teljes mértékben elvesztették mozgásképességüket. A mozgásképesség egyértelmű gátlását mutattuk ki egy jóval alacsonyabb szubinhbitórikus hígításban (1: 20,000) is.

A szegfűszeg illóolaj komponenseit GC-MS segítségével határoztuk meg. A VRK vanillin-kénsavas előhívás nyolc komponenst tett láthatóvá. A fő komponens, az eugenol narancsos-barnás foltként jelenik meg ($R_f=0.58$), a β -caryophyllene pedig lilás foltként az oldószeres határvonalnál látható. Az eugenol komponensen kívül, még további 5 azonosítatlan minor komponenst mutattunk ki VRK bioautográfia segítségével, amelyek gátló hatással rendelkeznek a *C. jejuni* ellen.

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy a szegfűszeg illóolajos kezelés hatására főleg az általános stresszben szerepet játszó gének expressziójának emelkedése dominált. Ugyanakkor az oxidatív stressz szerepét is jelentősnek tekintjük a kezelések hatására. Bemutattuk, hogy a szegfűszeg illóolaj képes befolyásolni bizonyos stressz és virulencia gének expresszióját. A szegfűszeg illóolaj kezelés a mozgást gátló hatását, funkcionális (motilitás) vizsgálattal is sikerült alátámasztani. Feltételezzük, hogy a szegfűszeg egy adott vagy bizonyos komponensei képesek egyes fehérjék vagy genetikai motívumok felismerésére és ezek funkcióinak gátlására.

A *C. jejuni* nagy molekulatömegű lipopoliszacharid struktúráinak kimutatására alkalmas módszer kifejlesztése

Egy korábbi módszer sikeres módosításával kimutattuk a *C. jejuni* létrafokszerű, nagy molekulatömeggel rendelkező poliszacharid struktúráit (HMW LPS). Olyan törzsek esetében is sikerült ezt alkalmazni, amelyek más módszerek alapján csak LOS-al rendelkeztek (**5. ábra**).



5. ábra A *C. jejuni* NCTC 11168 HMW struktúráinak izolálására alkalmazott módszerek főbb lépéseinek összehasonlítása. Publikált módszerek (1-3 oszlop) és a módosított módszerek (4-10 oszlopok).

Azt tapasztaltuk - az irodalmi adatoknak megfelelően-, hogy egyik irodalomban publikált módszerrel sem sikerült a HMW struktúrák detektálása. A módosított módszer kritikus lépései, amelyek a sikeres HMW izolációhoz lényegesek (4,6,8 oszlopok): magasabb (1 M) Tris koncentráció, a lysozyme és a proteinase K alkalmazása (**5. ábra**).

V. ÚJ EREDMÉNYEK

Főbb eredményeink az alábbiak:

- Meghatároztuk a genetikai rokonságot a Dél-Dunántúli régióból származó *C. jejuni* törzsek között, 69 RFLP és 122 PFGE csoportot azonosítottunk.
- Sikerült igazolni *flaA*-RFLP és PFGE alkalmazásával, hogy minden törzs független izolátumnak tekinthető, ami nagyrészt sporadikus előfordulásra utal.

- Nem találtunk összefüggést az egyes filogenetikai csoportok és az adott esetek tüneteinek súlyossága között.
 - A törzsek nagyfokú eltérést mutattak adhéziós és inváziós képességük tekintetében.
 - Általában nem volt összefüggés a fenotípusos vizsgálatok (*in vitro* adhéziós inváziós teszt, ECMP kötés teszt) eredményei és a betegekben okozott tünetek súlyossága között. Azonban, három törzs (2006-119, 2006-134, és 2006-165) *in vitro* virulensebbnek bizonyult a többi klinikai izolátumnál, és a betegadatok alapján súlyosabb tüneteket is okoztak. Azonban, három törzs (2006-119, 2006-134, és 2006-165) virulensebbnek bizonyult a többi klinikai izolátum közül és a betegadatok alapján súlyosabb tüneteket is okoztak.
- Főbb eredmények a virulenciával összefüggő faktorok vizsgálatával kapcsolatban, amelyek egy erősen patogén *C. jejuni* fenotípus megjelenéséhez vezetnek:
- Számos ismert és feltételezett virulenciával kapcsolatos gén felülszabályozódása mellett, a teljes transzkriptom analízis a sejtalakot meghatározó gének potenciálisan fontos szerepét is alátámasztotta.
 - Eredményeink alapján erősen feltételezzük, hogy a traszmembrán funkciók és a korai flagelláris gének aktív szerepet játszanak az invázió és a sejten belüli túlélés folyamatában.
 - Úgy véljük, hogy bizonyos adhéziós fehérjék, nem csak az adhézióban, de a sejt internalizációban, majd azt követően, a sejten belüli túlélésben is fontos szerepet játszhatnak.
- Főbb eredmények a szegfűszeg illóolaj *C. jejuni* elleni gátló hatásával kapcsolatban:
- A szegfűszeg illóolaj jelentős morfológiai változásokat indukált a *C. jejuni* sejten.
 - A kezelés hatására kialakult általános stressz válasz dominánsabbnak bizonyult az oxidatívval szemben.
 - Egyes virulenciával összefüggő faktorok (csilló, adhezinek) gátlása egyértelműnek bizonyult.
 - Az eugenol mellett további – eddig azonosíthatatlan komponensek - *C. jejuni*-ellenes hatását tapasztaltuk.
- A *C. jejuni* nagy molekulatömegű lipopoliszacharid struktúráinak kimutatására alkalmas módszer kifejlesztése
- Egy korábbi módszert úgy módosítottunk, hogy a *C. jejuni* létrafokszerű, nagy molekulatömeggel rendelkező poliszacharid struktúrái immáron kimutathatóvá váltak egyszerű ezüstözéssel eljárással is.
 - A továbbfejlesztett módszer egyszerű, és mivel nem igényel specifikus antiszérumot, alkalmazhatósága széleskörű.

VI. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani, **Dr. Schneider Györgynek**, témavezetőmnek, hogy mindvégig segített és támogatott Ph.D. tanulmányaim során.

Hálás köszönettel tartozom **Professor Emódy Leventének**, a munkáim során nyújtott komoly szakmai támogatásért.

Szeretném megköszönni a Ph.D. munkám előopponensi bírálatát **Dr. Bártai Istvánnak**, **Dr. Péterfi Zoltánnak** és **Dr. Gazdag Zoltánnak**.

Szeretnék köszönetet mondani **Dr. Kocsis Bélának** a lipooligoszacharid kísérletek során nyújtott szakmai tanácsait.

Köszönöm továbbá minden kollégámnak a sok segítséget, amelyek mind hozzájárultak disszertációm még teljesebbé tételéhez. Köszönöm: **Professor Seress László**, **Dr. Ábrahám Hajnalka**, **Dr. Horváth Györgyi**, **Makszin Lilla**, **Molnár Éva**, **Dr. Sonnevend Ágnes**, **Dr. Maróti Gergely**, **Dr. Márk László** és **Schmidt János**.

Mindent köszönök az Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézet összes dolgozójának. Külön köszönet illeti **Horváth Mariannát** és **Dr. Kerényi Monikát**, akik támogattak és bíztattak munkám során.

Örök hálával tartozom **Lajkó Rózsának**, számos gyakorlati kérdésben nyújtott segítségért.

Külön köszönöm minden Ph.D. társamnak: **Felső Péternek**, **Dorn Ágnesnek**, **Kindl Máriának**, **Dr. Szijártó Valériának**, **Dr. Melegh Szilviának**, **Dr. Kovács Beátának** és **Dr. Vígvári Szabolcsnak**.

Szerencsés vagyok, hogy Ph.D éveim alatt egy ilyen fantasztikus kutatócsoport része lehettem. Mindig számíthattam segítségetekre és támogatásotokra. Habár ez „team” már nem létezik, mindig nagy szeretettel gondolok vissza az együtt töltött időkre.

Végül, de nem utolsó sorban hatalmas hálával tartozom **családomnak**, akik személyes és tanulmányi pályafutásom minden lépését segítették és támogatták, és nagyon várták, hogy az Ő álmaik is valóra váljon. Hálás vagyok **Dr. Pápai Zoltánnak** és **családjának** szeretetükért, támogatásukért és türelmükért. Köszönöm.

VII. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

Eredeti közlemények

- Sonnevend Á, Kovács J, Pál T, Akawi N, Nagelkerke N, Schneider G. Lack of correlation between the 257C-to-T mutation in the gyrA gene and clinical severity of *Campylobacter jejuni* infection in a region of high incidence of ciprofloxacin resistance Scand J Infect Dis. 2011; Dec; 43 (11-12):905-11. (IF: 1,722)

- **Kovács JK**, Felső P, Emődy L, Schneider Gy, Kocsis B. Improved Isolation Protocol to Detect High Molecular Weight Polysaccharide Structures of *Campylobacter jejuni*. J Microbiol Meth. 2014; Sept 13. (IF: 2,096)

Előadások

- **Kovács JK**, Horváth Gy, Kocsis B, Schneider Gy. Antibakteriális Illóolajok Hatásmódjainak Kísérletes Vizsgálata. Congress of Hungarian Society for Microbiology, Hungary, Keszthely, 2014. Okt. 15-17. (**Legjobb fiatal előadói díj**)
- **Kovács JK**. Mode of Antimicrobial Action of Clove Essential Oil Against the Foodborne Pathogen *Campylobacter jejuni*. III. Interdiszciplináris Doktorandusz Konferencia, Hungary, Pécs, 2014. Ápr. 15-17. (**Legjobb fiatal előadói díj**)
- **Kovács JK**, Emődy L, Schneider Gy. *Campylobacter jejuni* patomechanizmusában szerepet játszó virulencia faktorok és gazda-parazita interakció vizsgálata. II. Interdiszciplináris Doktorandusz Konferencia, Hungary, Pécs, 2013. Máj. 15-17.

Poszterek

- **Kovács JK**, Felső P, Emődy L, Schneider Gy, Kocsis B. Lipopolysaccharide structure based comparative analysis of different *Campylobacter jejuni* strains. 4th Central European Forum for Microbiology, Hungary, Keszthely, 2013. Okt. 16-18. (**Legjobb fiatal előadói díj**)
- **Kovács JK**, Felső P, Horváth Gy, Emődy L, Schneider Gy. *Campylobacter jejuni* törzsek lipopoliszacharid mintázatának vizsgálata növényi illóolajok hatására. Congress of Hungarian Society for Microbiology, Hungary, Keszthely, 2012. Okt. 24-26.
- Dorn Á, Horváth Gy, **Kovács JK**, Schneider Gy. Effect of herbal extracts on the growth of pathogenic bacteria. Congress of Hungarian Society for Microbiology, Hungary, Keszthely, 2010. Okt.
- **Kovács JK**, Emődy L, Schneider Gy. Adhesion potential of human isolate *Campylobacter jejuni* to the extracellular matrix proteins type IV collagen, fibronectin and laminin. Congress of Hungarian Society for Microbiology, Hungary, Keszthely, 2010. Okt.

- **Kovács JK**, Beer B, Emődy L, Schneider Gy. Virulence potential of inpatient *Campylobacter jejuni* isolates in South- West Hungary. FEMS, NoE EuroPathoGenomics and ERA-NET PathoGenoMics Conference, Hungary, Pécs, 2010. Ápr. 22-24.
- **Kovács JK**, Sonnevend Á, Buruncz A, Schneider Gy. Comparative genetic analysis of human *Campylobacter jejuni* strains isolated from the Southern Region of Hungary by *flaA*-RFLP and PFGE. NoE EPG 4th Student Meeting, Spain, Palma de Mallorca, 2009. Ápr. 27-29.

VIII. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL NEM SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

Poszterek

- **Kovács JK**, Dorn Á, Schneider Gy, Emődy L, Molnár J, and Makovitzky J. Analysis of the cell surface of *Campylobacter spp.* and *Helicobacter pylori* by charge transfer reactions. 54th Symposium of the Society for Histochemistry, Austria, Vienna, 2012. Szept. 5-8.
- Kovács B, Dorn Á, **Kovács J**, Kerényi M, Emődy L. Investigation on the haemolytic activity and matrix protein binding capacity of asymptomatic bacteriuria *Escherichia Coli* solates. 16th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, Hungary, Budapest, 2011. Júl. 20-22.

