

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

1. Bevezetés

1.1. Urolinfekciók

A húgyúti fertőzések a fejlett országok leggyakoribb fertőző betegségei közé tartoznak. Élete során minden második nő legalább egyszer húgyúti fertőzéssel. Az USA-ban évente kb. 7 millió beteg fordul orvosához húgyúti fertőzéssel, amelyek kezelési költsége meghaladja az 1 milliárd dollárt. Hazánkban - a lakosság arányában - hasonló a betegség előfordulása és kezelésének anyagi vonzata.

Míg az egyszerű (ún. nem komplikált) fertőzés könnyen gyógyítható, addig a komplikált fertőzések gyakran a hosszabb és költségesebb terápiával szemben is ellenállóak, ill. magas a rekurrens fertőzések aránya. Komplikált fertőzésről beszélünk, ha az a felső húgyútiakat érinti (pyelonephritisz), vesesületet vagy szerzett hajlamosító tényező áll fenn, immunszuppresszió és immundeficiencia esetén, valamint ha tettesekben vagy férfiakban alakul ki a betegség. Ide sorolhatjuk továbbá a megszakított kezelési stratégiára rezisztens és a visszatért (relapszus vagy reinfekció) fertőzéseket. A terápiára rezisztens és/vagy rekurrens fertőzések septicaemiához, krónikus pyelonephritishoz, végső esetben pedig veselégtelenséghez vezethetnek. A haemodialízis ill. vesetranszplantáció egyik gyakori indikációja a krónikus pyelonephritisz következtében kialakult veselégtelenség. Ezért az utóbbi időben felmerült a különösen veszélyeztetett betegcsoportok vakcinációjának szükségessége.

1.2. Uropathogén *Escherichia coli* virulencia faktorai és ezek regulációja

A húgyúti fertőzések leggyakoribb kórokozója az *Escherichia coli*. Ez az egyetlen species felelős az ambuláns esetek 70-95%-áért, valamint a nosocomiális fertőzések közel feléért. A húgyúti fertőzések túlnyomó többsége (>95%) ún. ascendáló fertőzés, vagyis a beteg a saját bélflórájából származó baktériummal fertőződik. A húgyúti patogén *E. coli* törzsek olyan virulencia faktorokkal rendelkeznek, amelyek lehetővé teszik a baktérium túlélését, kolonizációját és invázióját a húgyútkon belül, vagyis felelősek a törzs urovirulenciájáért. A virulencia faktorokat kódoló géneket a kórokozó törzsek horizontális géntranszfer során bakteriofágok, plazmidok vagy pathogénitási szigetek révén akvirálják.

Számos uroinfekcióval kapcsolatos virulencia faktort leírtak, amelyek közé különböző adhezinek, toxinok, sziderofór és egyéb vasfelvételt elősegítő rendszerek, bizonyos szomatikus (O-) és tok (K-) antigének tartoznak. Ezekon kívül fontos a szérum baktérioid

Virulencia gének regulációja uropathogén *Escherichia coli*-ban

Dr. Nagy Gábor

Pécsi Tudományegyetem

Orvosi Mikrobiológiai és Immunológiai Intézete

Témavezető: Dr. Embódy Levente

Pécs, 2002

hatásával szembeni ellenálló-képesség, az ún. szérum rezisztencia jelensége, amely multifaktoriális, nem vezethető vissza egyetlen virulencia faktor-jelentéére.

Mivel a virulencia faktorok egyrészt specifikusak a patogén törzsekre (vagyis a kommensális bélflóra törzsek többségében nincsenek jelen), másrészt a fertőzés létrejöttéhez ép húgyúti rendszer esetén elengedhetetlenek, ezért a jövőbeli antimikrobiális terápia célpontjaitól szolgálhatnak. Emellett a virulencia faktorok elleni immunválasz erősítése kivédheti a fertőzés kialakulását. Kimutatták, hogy kevésbé fogékonyak húgyúti fertőzéssel szemben azok az egyének, akiknek szérumban a virulencia faktor-ellenes antitestek magasabb titerben vannak jelen. Több munkacsoport beszámolt sikeres vakcinálási eredményekről FimH (közönséges fimbria adhesin alegysége) antigén alkalmazása esetén. Ezek az eredmények alátámasztják a virulencia faktorok alaposabb megismerésének fontosságát mind a vakcinálás, mind az antimikrobiális terápia szempontjából.

A virulencia faktorok kifejeződése általában szigorú szabályozás alatt áll. Az állandó (konstitutív) expresszió ritka, mivel egyrészt energetikai szempontból megterhelő lenne a baktérium számára, másrészt bizonyos faktorok idő előtti kifejeződése kimondottan hátrálthatja a fertőzés „normális” menetét. A virulencia faktorok expressziója jellemzően csak a gazdaszervezetben detektált különböző szignálok hatására indul be. Ilyen paraméterek a hőmérséklet, pH, oszmolaritás, vaszegény környezet, stb. Ezek a hatások különböző specifikus vagy globális regulátor gének átvitálását indukálják, amelyek a virulencia gének expresszióját szabályozzák.

A virulencia faktorok egymásra utalnak, hatásukat kooperációban fejtik ki. Ebből következik, hogy egyetlen virulencia gén aktiválása nem tesz patogénné egy különben apathogén törzset. Fordítva: egy patogén törzs egyetlen virulencia faktornak inaktiválása ritkán vezet a virulencia teljes mértékű elvesztéséhez. Ezzel szemben bizonyos regulátor gének mutációja eredményezheti több virulencia faktor expressziójának párhuzamos csökkenését. A több virulencia faktor kifejeződését befolyásoló fehérjéket globális virulencia regulátoroknak nevezzük. Ezek inaktiválása általában bizonyos virulencia faktorok expressziójának csökkentéséhez, de nem teljes eltűnéséhez vezet. Azok a globális virulencia regulátor mutánsok, amelyek avirulenssé válnak, de az ellenanyag-termelés kiváltásához elegendő virulencia faktort expresszálnak, potenciális vakcina jelöltek lehetnek.

1.3. Az *Escherichia coli* '536' törzs

Kísérleteink során modell törzsként egy már viszonylag jól karakterizált törzset, az akut pyelonephritis esetből izolált *E. coli* '536'-ot használjuk. Az *E. coli* '536' (O6:K15:H31)

legalább 4 patogenitási szigetet hordoz a kromoszómáján, amelyeken számos virulencia faktor génje helyezkedik el. A törzs két α -haemolysin determináns mellett, P related-, S-, type I- és curli fimbria szintéziséért felelős operonokkal rendelkezik. Legalább két különböző sziderofór rendszert szintetizál, valamint a közelműltben leírt haemin receptor (Chua) molekulával is rendelkezik. A törzs virulenciája számos egér modellben bizonyítható nyert. Egy kozmid génbank specifikus átfedő klonjának segítségével a négy ismert patogenitási sziget szekvenálása megtörtént és közlés alatt áll. Különböző mutánsok vizsgálata során azonban felmerült, hogy a törzs az eddig leírtakon kívül egyéb virulencia faktort is rendelkezhet.

2. Előzmények és célkitűzések

2.1. Az α -haemolysin expressziójának vizsgálata

Az α -haemolysin szintéziséért, aktivációjáért és szekréciójáért felelős operon négy génből áll (*hlyCABD*), amelyeknek nukleotid szekvenciája jól konzervált különböző plazmidon és kromoszómán kódolt determinánsok között. Ezzel szemben az 5' határoló régiók (ún. leader szekvenciák) nem mutatnak szekvencia-homológiát, ennek következtében az operonok expressziója is nagymértékben eltérő lehet. Ezen felül a gének transzkripcióját számos regulátor fehérje befolyásolja, amelyek nagy része szintén a leader szekvencián elhelyezkedő specifikus DNS szakaszokon keresztül fejt ki a hatását. Az eddig karakterizált regulátorok vizsgálata során felmerült, hogy ezeken felül egyéb regulációs hatások is befolyásolják a toxin kifejeződését.

Hogyan nagyobb betekintést nyerjünk az α -haemolysin kódoló operon expressziójának szabályozásába, a következő stratégiát követjük:

- ◆ Az *E. coli* '536' mindkét *hlyCABD* operonja (*hlyI* és *hlyII*) patogenitási szigeten helyezkedik el, amelyek sponán delációja *hlyI* ill. *hlyII* mutáns törzsek létrejöttét eredményezi. Ezen törzsek haemolitikus aktivitásából következtetni lehet az egyes determinánsok expressziójának mértékére.
- ◆ A két *hly* determináns nukleotid szekvenciájának meghatározásához terveztük:
 - Egy kozmid génbank létrehozását
 - A *hlyI* ill. *hlyII* operonokat tartalmazó klonok szelekcióját
 - A *hly* determinánsok szekvenálását és a szekvenciák összehasonlító elemzését

- ◆ A nukleotid szekvencia ismeretében terveztük mindkét determináns klónozását. Ezen kívül terveztük rekombináns *hly* operonok létrehozását, amelyekben a két operon upstream régióját egymással kicseréltük.
- ◆ A klónozott *hly* operonok által meghatározott *in vitro* és *in vivo* mért haemolitikus aktivitás, valamint az intracelluláris és szekretált toxin mennyiségének meghatározása lehetővé tenné a két determináns által kódolt eltérő aktivitás hátterének tisztázását.

2.2. Rfah fehérje mint virulencia regulátor vizsgálata

Az α -haemolysin toxin expressziójának egyik legjobban karakterizált regulátora az Rfah fehérje. Az Rfah fehérje transzkripcióra gyakorolt (ún. antiterminációs) hatása egy *cis* módon ható specifikus régió (JUMPStart szekvencia) egyidejű jelenlétével valósul meg, és hosszú, polycisztronos operonok polarizációjának csökkenésében nyilvánul meg.

Mivel az α -haemolysin toxin a gazdaszövetek destrualása révén a baktériumokat különböző tápanyaggal (pl. vas tartalmú haemmel) látja el, ezért funkcionális kapcsolatban áll a közelműltben leírt külső membrán fehérjével, a haemin receptor Chua molekulával. Feltehetően, hogy ez a kapcsolat valami módon a molekulák kifejeződésének szabályozása szintjén is fennáll, ezért célul tűztük ki az Rfah regulátornak a haemin receptor Chua expressziójára gyakorolt hatásának vizsgálatát a következő módon:

- ◆ A haemin receptor fehérje molekulák szintjének összehasonlítása *E. coli* '536' vad törzsben és izogén *rfaH* mutánsában Western blot technikával.
- ◆ A Chua szintekben fennálló esetleges különbségek eredetének tisztázására (vagyis, hogy a különböző fehérje szintek a gén eltérő mértékű transzkripciójára vezethetők-e vissza) specifikus mRNS szintek meghatározását terveztük Northern blot alkalmazásával.
- ◆ A *chuA*36 gén szekvenciájának meghatározásával az ún. JUMPStart szekvencia kimutatását kíséreltük meg.

Irodalmi adatok bizonyítják, hogy az Rfah számos egyéb potenciális virulencia faktor expresszióját befolyásolja különböző eredetű *Escherichia coli* és *Salmonella enterica* törzsekben. Célul tűztük ki annak igazolását, hogy az Rfah fehérje globális virulencia regulátor, tehát több virulencia faktor expressziójának módosításán keresztül hatással van az uropathogén *Escherichia coli* virulenciájára. Ennek bizonyítására terveztük:

- ◆ Különböző virulencia faktorok (tok, LPS, szideroforok, fimbrinák, csilló és α -haemolysin) mennyiségi, szerkezeti ill. funkcionális összehasonlítását vad törzs és izogén *rfaH* mutáns esetén.
- ◆ Az *rfaH* mutáns csökkent virulenciájának kimutatását különböző állatkísérletben.

3. Módszerek

3.1. Baktériumtörzsek

Vizsgálataink fő tárgya a pylonephritis esetből izolált *E. coli* '536' törzs volt. A rekombináns plazmidok vizsgálatához *E. coli* K-12 laboratóriumi törzseket használtunk. A Chua molekula variánsainak megoszlását extrainesztinális és enterális *E. coli* izolátumokon vizsgáltuk.

3.2. Táptalajok és tenyésztés

Az Oxoid, Difco és Biolab cégek táptalajait használtuk 1,5% agar hozzáadásával vagy anélkül. A vérsagar táptalaj 5% defibrinált marhavért tartalmazott. A táptalajokhoz szükség esetén adott antibiotikumok végkoncentrációja megfelelt a szakirodalomban általánosan használt koncentrációnak. A tenyésztést 37 °C-on végeztük.

3.3. Kozmid könyvtár készítése és a klónok szelekciója

E. coli 536 kromoszómális DNS *Sau3AI* restrikciós endonukleázzal történő emésztése után a fragmentumokat a SuperCos-1 kozmid vektor kompatibilis hasfái helyére (*BamHI*) klónoztuk. A fág partikulumokba történő *in vitro* csomagolás után a rekombináns kozmidokat az *E. coli* XL-1 Blue laboratóriumi törzsbe transzdukciónál juttattuk be. A *hly* és *chu* pozitív klónokat kolónia blot és ezt megerősítő Southern blot módszerrel azonosítottuk.

3.4. DNS szekvenálás

A *hlyCABD* és *chuA* gének nukleotid szekvenciáját tisztított kozmid templátok felhasználásával az ún. 'primer walk' módszerrel ABI Prism 310 automata szekvenálóval határoztuk meg.

3.5. Génklónozás

A *hly* operonokat különböző hosszúságú leader szekvenciával együtt PCR-rel amplifikáltuk. A primeren elhelyezett restrikciós helyek hasítása után a tisztított fragmentumokat pUC18 plazmid azonos hasítási helyére klónoztuk be. A rekombináns *hly* operonokat a megfelelő 5' és 3' fragmentumok ligálásával (*hlyC* génben levő egyetlen *Bam*HI helyen) hoztuk létre és ugyanúgy pUC18 plazmidba klónoztuk. Az összes rekombináns plazmidot *E. coli* DH5 α törzshez transformáltuk a CaCl₂ módszerrel.

3.6. Haemolysin teszt

Mosott 1%-os humán vörösvértesti szuszpenzióhoz különböző törzsek logaritmusos fázisban levő kultúrájából származó felülúszó sorozathígításait kevertünk. A megfelelő inkubáció után a felszabadult haemoglobin mennyiségét a szuszpenzió felülúszójából fotometriás úton határoztuk meg.

3.7. Western blot

Teljes baktériális lizátumot szeparáltunk SDS-PAGE módszerrel Laemmli szerint. A fehérjéket nitrocellulóz filterre blotoltuk, majd a kértéses fehérjét specifikus szénnummal és jelölt szekunder antitesttel luminoográfia segítségével detektáltuk.

3.8. Southern és Northern blot

A tisztított kromoszómális DNS-t *Bgl*II enzimmal hasítottuk és a fragmentumokat agaróz gélben szeparáltuk. Az RNS-t RNeasy Mini Kit segítségével tisztítottuk és formamid-agaróz gélben szeparáltuk. A nukleinsavakat mindkét esetben nylon filterre blotoltuk, majd jelölt specifikus PCR termékkel hibridizáltuk. A hibridizált nukleinsavakat röntgen filmen luminoográfiaval láthatóvá.

3.9. LPS analízis

A baktériumokat 30 perc főzés után 10 percig ultrahanggal kezeltük. Az LPS molekulákat a Hitchcock és misai által leírt módszerrel tisztítottuk és SDS-PAGE-vel szeparáltuk. Fixálás után a molekulákat ezüstözéssel tettük láthatóvá.

3.10. Tokantigén kimutatása ELISA módszerrel

A baktériumokat (10⁹ CFU/ml) éjszakán át köröztük ki ELISA lemezhez. Az általunk termelt tok-elleni (K15) savó és HRP-O-jelölt anti-nyúl immunoglobulin felhasználásával határoztuk meg a termelt tokantigén mennyiségét.

3.11. Sziderofór teszt

A sziderofórok által megkötött vas mennyiségét a Chrome Azuroil S (CAS) teszt segítségével vizsgáltuk. Minimál tápoldatban felhővesztett baktérium szuszpenziót 3 órán keresztül különböző végkoncentrációjú (0,1-0,4 mM) 2,2' dipiryridyllel (vas kelátor molekula) inkubáltunk, hogy a sziderofórok expresszióját indukáljuk. Centrifugálás után a felülúszót egyenlő mennyiségű CAS reagenssel kevertük össze, majd a színváltozás mértékét (amely arányban áll a megkötött vas mennyiségével) fotométerrel detektáltuk.

3.12. Szérum rezisztencia vizsgálata

100 μ l mosott baktériális szuszpenziót (10⁶ CFU/ml) inkubáltunk egyenlő mennyiségű normál humán szérum hozzáadása után 37 °C-on. Mintaikat vertünk 0,5; 1; 2; 3 és 4h inkubálás után és meghatároztuk az élő csíraszámot.

3.13. Tüdő toxicitási teszt egérben

Ebben a modellben a kísérleti állatok az α -haemolysin által kiváltott haemorrhagias tüdőödémában pusztulnak el, így az elhullás arányából az *in vivo* szekretált toxin mennyiségére következtethetünk. A vizsgálatot a Hacker és misai által leírt módon végeztük.

3.14. Ascendáló húgyúti fertőzés egérben

3-4 napos egereket közvetlenül a hasfalon keresztüli intravezikulárisan fertőztünk. A tüdőöket a fertőzést követő 21. napon feláldoztuk és meghatároztuk a körözhető csíraszámát a vérében, vizeletben, a hólyagban és mindkét vesében.

3.15. Koinfekciós modell

A fenti állatkísérlet módosított változata. Az újszülött egereket két törzs (a vad törzs és annak izogén *rfaH* mutánsa) különböző arányú keverékéből álló szuszpenzióval a fent leírt módon fertőztük. A mutáns törzs járulékos antihiótikum szelektív markerrel rendelkezik a vad törzshöz képest, ami lehetőséget adott mindkét törzs csíraszámának külön-külön

meghatározására. A vizelettel való ürítésüket 20 napon keresztül követjük a higított vizelet-minia megfelelő antibiogramokat tartalmazó agar lemezekben történő tenyésztése segítségével. Három hét elteltével a tullel egerekben mindkét törzs csíraszámát meghatározzuk a fenti leírt szervekből.

4. Eredmények

4.1. Az '536' törzs két *hly* determinánssa mennyiségileg különböző haemolytikus aktivitást vált ki

A haemolysin operonokat kódoló patogénitási szigetek elvesztése (PAI I₃₃₆, ill. PAI I₁₃₆) olyan deletációs mutánsokat eredményezett, amelyek *in vitro* haemolytikus aktivitása jelentősen elért egyhátsól. A PAI I₁₃₆ elvesztése csak mintegy 60%-ra (nem szignifikáns mértékben) redukálta a haemolytikus aktivitást, ezzel szemben a PAI I₃₃₆ deletója 5%-ra csökkentette a mutáns haemolytikus képességét a vad törzshöz viszonyítva.

4.2. A két *hlyCABD* operon nukleotid szekvenciájának analízise

A négy génből álló operonok (~7,3 kb) és ezek 5' határoló régióinak szekvenálása (~2 kb) során azt találtuk, hogy míg a kódoló régiók nukleotid szekvenciája nagyfokú homológiát mutat (98,43%), addig a leader szekvenciák teljesen eltérőek. Ugyanakkor, a *hlyI* upstream régiója nagyfokú hasonlóságot mutat egy másik jól karakterizált uropathogén *Escherichia coli* törzs (J96) megfelelő régiójával. Ezzel ellentétben a *hlyII* upstream régióját illetően csak nagyon rövid szakaszra kiterjedő és relative alacsony homológiát mutató szekvenciák találhatóak az elérhető adatbázisokban.

4.3. Klónozott *hly* operonok expressziója és az általuk kiváltott haemolytikus aktivitás

Az '536' törzs mindkét *hly* operonját azonos hosszúságú leader szekvenciával pUC18 vektorba klónoztuk. Emellett olyan rekombináns klónokat hoztunk létre, ahol az egyik operonból származó upstream régiót fuzionáltuk a másik operon struktúrgénjével és *vice versa*. Ezen klónok által termelt α -haemolysin toxin mennyiségét meghatározva azt tapasztaltuk, hogy a klónozott *hlyI* determináns expressziója lényegesen meghaladja a *hlyII*-ét, mivel a Western blotol detektált HIYA mennyisége mind intracellulárisan, mind a felülszoban lényegesen nagyobb volt a *hlyI* determinánst hordozó klón esetében. A *hlyI*

leader szekvenciájának fúziója a *hlyII* struktúrgénekkel az expresszió mértékének nagyfokú növekedésével járt, míg fordított esetben a toxin expressziója csökkent.

A plazmidok haemolytikus aktivitásának vizsgálata során azt találtuk, hogy a *hlyII* operon által kódolt HIYA toxin lényegesen magasabb biológiai aktivitást mutatott, mint a másik operonból kifejezett HIYA. A determinánsok expressziójának módosítása (az upstream régiók felcserélése) csak kis mértékben volt hatással az egyébként szignifikánsan különböző haemolytikus aktivitásra.

Az *in vivo* haemolytikus aktivitás meghatározására alkalmas eger modellben (tűdő toxicitási tesz) kapott eredmények megerősítették az *in vitro* adatokat. A klónozott *hlyII* operont tartalmazó rekombináns laboratóriumi törzs szignifikánsan magasabb elhullást eredményezett ebben a modellben, mint a klónozott *hlyI* determinánst hordozó ugyanezen törzs. A fúziós *hly* molekulákat hordozó törzsek által kiváltott elhullás lényegesen nem tért el a homológ leader szekvenciát tartalmazó törzsekétől.

4.4. A *hlyI* upstream régióban található cis-aktív regulátor hely elhelyezkedése

A *hlyI* operont különböző hosszúságú leader szekvenciával együtt pUC18 vektorba klónoztuk. Az 500 és 1000 bp leader szekvenciát tartalmazó klónokból származó HIYA mennyisége alacsonyabb volt mint a hosszabb 5' régió tartalmazó klónok esetén. Ezzel szemben az *in vitro* (haemolysin teszt) és *in vivo* (egér modellben) elvégzett biológiai hatás szignifikánsan magasabb volt a rövidebb leader szekvenciák tartalmazó klónok esetén. A kérdéses régióban található potenciális ORF-ek között az 100 bp-es kompatibilis plazmidot a rövid leader szekvenciát tartalmazó rekombináns *hlyI* plazmidokkal koranszformáltuk. A klónozott ORF azonban nem volt képes megindítani a haemolízist, haemolytikus aktivitást, így egy *trans*-módon való *hlyI* indukcióhoz szükséges. Ez a kísérlet kizártuk.

4.5. Az α -haemolysin toxin és a haem receptor ChuA molekula expressziója együttesen regulálta az RfAH transzkripciót regulátor fehérje által

Irodalmi adatokkal összehangban azt találtuk, hogy az *rfaH* gén null-mutációja a haemolytikus aktivitás szinte teljes megszűnését eredményezi az *E. coli* '536' törzs esetén. Kimutattuk, hogy a haem receptor ChuA molekula (amely a gazdaszövetek IZise során felszabaduló haem molekulák révén a baktériumok vassal való ellátását segíti elő, így az α -haemolysinnel funkcionális kapcsolatban áll) expressziója szintén nagymértékben függ az RfAH fehérje jelenlététől. Az 536 *rfaH* mutánsban mind a ChuA fehérje, mind a specifikus

mRNS szintje lényegesen alacsonyabb volt, mint a vad törzsben. Az *rfaH* gén plazmidon való *trans*-komplementációja helyreállította a mutáns törzsben az expresszió mértékét. A *chuA*₅₃₆ gén szekvenálása során azonosítottuk az ún. TUMPSIart szekvenciát, amely az RfaH által regulált génekben található 30-40 bp-nyi konzervált DNS motívum.

4.6. A ChuA molekula két variánsának jellemzése és ezek megoszlása különböző *pathocsoport*hoz tartozó *E. coli* törzsekben

A *chuA*₅₃₆ gén nukleotid szekvenciája nagyfokú hasonlóságot mutat a korábban szekvenált enterohaemorrhagiás *E. coli* (EHEC) eredetű *chuA*_{EDL933} génnel. A gének leader szekvenciájában azonban két pentanukleotid direkt repeat közötti régió eltérő szekvenciát tartalmaz, amely rekombinációra utal. Továbbá, Southern hibridizáció során a két gén eltérő méretű fragmennumon található, ezért feltételezően a géneket határoló régiók is különbözőek. A két eltérő variáns előfordulásának vizsgálására Southern hibridizációt végeztünk 44, különböző *pathocsoport*hoz tartozó *E. coli* törzssel. A kapott eredmények azt bizonyítják, hogy az '536-os variáns hordozza az összes általunk vizsgált uropathogén (UPBC) és újszülöttek meningitisét okozó (NBM) törzs, míg az EDL933-as változat az O157-es szerocsoportú enterohaemorrhagiás valamint egyes enteropathogén (EPEC) és enteroinvázív (EIEC) *E. coli* genomjában található meg. Az enterogregatív (EAGGEC), az enterotoxikus (ETEC), és az O157-től eltérő szerocsoportú EHEC izolatok nem hordozzák a *chuA* gént.

4.7. Az RfaH fehérje az uropathogén *E. coli* globális virulencia regulátora

Vizsgáltuk az RfaH regulátor fehérje szerepét az *E. coli* '536' törzs virulencia faktorainak expressziójában. A már említett α -haemolysinre és haem receptorra kifejtett hatáson kívül az RfaH hiánya az II-es típusú polyszaharid tok kifejeződésének csökkentéséhez vezetett. Az LPS szerkezetében az O-specificus oldalánok hiányát mutattuk ki az *rfaH* mutánsban, vagyis az RfaH elvesztése ún. 'R' fenotípust eredményezett. A csilló, különböző fimbrák és sziderofórok expressziójában nem találtunk különbséget a vad törzs és izogén *rfaH* mutánsa viszonylatában. Összefoglalva: az RfaH fehérje szükséges az α -haemolysin, a haem receptor ChuA, a tok és az LPS normális kifejeződéséhez. Mivel e komponensek az *E. coli* törzsek bizonyított virulencia faktorai, az RfaH az uropathogén *E. coli* globális virulencia regulátorának tekinthető.

4.8. Az RfaH fehérje hiánya a szérum rezisztencia megszüntetéséhez vezet

Az uropathogén izolatunkokra jellemző virulencia paraméter, hogy rezisztensek a normál szérum baktericid hatással szemben. Az *E. coli* '536' vad törzs 4 órás inkubálás során nemcsak túlélt, hanem növekedésre is képes volt humán szérumban. Ezzel szemben az izogén *rfaH* mutáns 30 percen belül elpusztult 50%-os humán szérumban. A *trans*-komplementált mutáns a vad törzshöz hasonlóan ellenálló volt a szérum baktériumölő hatásával szemben.

4.9. Az RfaH regulátor elvesztése csökkenti az *in vivo* virulenciát

Ascendáló húgyúti egér modell használatunk annak bizonyítására, hogy a fent említett virulencia faktorok csökkent expressziója az *rfaH* mutáns esetében az *in vivo* virulencia tényleges attenuálását eredményezi. A modellen a vad törzssel való fertőzés során 100%-os lethálitást kiváltó dózis az *rfaH* mutáns esetében csak 18%-os elhullást eredményezett.

A koinfekciós modellen bizonyítottuk, hogy a mutáns törzs a hólyagba való befeccsendezés után kitűrt a vizeletet, míg a vad törzs urfekt cefaszáma nem csökkent lényegesen 20 napon keresztül. A 21. napon történt boncolás alkalmával a vad törzset a vesékből is magas számszámban tudtuk visszanyerni, míg a mutáns törzs 100-szor nagyobb dózissal történő fertőzés után sem volt kimutatható. Az, hogy az '536/*rfaH* törzset a vesékből egyáltalán nem tudtuk kinyerni azt bizonyítja, hogy az RfaH fehérje hiányában az egyébként nephrovirulens törzs nem képes ascendáló húgyúti fertőzést kiváltani.

5. Összefoglalás és következtetések

A virulencia faktorok egy species virulens törzseivel asszociált járulékos sejtkomponensek, amelyek elősegítik a fertőzés létrejöttét és a betegségre jellemző tünetek kialakulását. A fajlagosan ellenük irányuló védekezés a fertőzések elleni beavatkozások egyik legértesebb lehetőségét kínálja, hiszen így módon szelektíven a *pathogén* mikroorganizmusok megbetegítő-képességét lehetne blokkolni a normál flóra funkcióinak megzavarása nélkül. A virulencia faktorok kifejeződése szigorúan szabályozott, amelyet általában regulátor fehérjék komplex, egymással összefüggő "hálózata" irányít. A fertőzés kialakulásáért felelős komponensek expressziójának gátlása a virulens törzsek attenuálásához vezethet. Ebből a szempontból különösen fontosak lehetnek azok a regulátorok, amelyek több virulencia faktor együttes kifejeződéséért felelősek (ún. globális virulencia regulátorok).

Az α -haemolysin toxin az uropathogén *Escherichia coli* egyik legfontosabb virulencia faktora, amelyet irodalmi adatok szerint a vesét is érintő fertőzésekben izolált törzsek 40-50%-a szekretál. A kísérleteink során használt pyelonephritisből származó törzs két teljes, különálló, a toxin expressziójáért, aktiválásáért és szekréciójáért felelős operonnal rendelkezik. A négy génből álló haemolysin operonok kódoló régiói nagyfokú szekvencia homológiát mutatnak, ezzel szemben az 5' határoló régiók (ún. leader szekvenciák) teljesen eltérőek a két operon esetében. Ennek ismeretében nem meglepő, hogy a két operon expressziójának mértéke jelentősen eltérő. A *hlyI* operon kifejeződésében szerepet játszhat az 5' határoló régióban elhelyezkedő szekvencia, amely kísérleteink alapján egy potenciális, *cis* módon ható regulációs helyet tartalmaz. Érdekes módon azonban az alacsonyabb szinten (a *hlyI* operonról) expresszált toxin biológiai aktivitása szignifikánsan magasabb, amely a két toxin molekula közötti kisfokú különbség (az 1024 aminosavból álló fehérjék csak 13 aminosavban különböznek) fontosságára hívja fel a figyelmet. További kísérletek szükségesek annak tisztázására, hogy mi az evolúciós jelentősége egy alacsony expresszió mellett is aktív toxin mellett egy kevésbé aktív másodík *hly* determináns hordozásának.

Az α -haemolysin a gazdaszövetek destrúciója során nemcsak a mélyebb szöveti invázió lehetőségét teremti meg, hanem a sejtekből felszabaduló termékekkel a baktériumok különféle anyagcsere folyamatait is segítheti. A nélkülözhetetlen vas haem molekulák formájában való felvételért felelős membrán proteint a közelműltben írták le. Igazoltuk, hogy a haemin receptort kódoló *chuA* génnek két variánsa létezik, amelyek a határoló szekvenciákban különböznek. A két változat a különböző megbetegedést okozó törzsekben szabályos elrendeződést mutat, vagyis az azonos pathocsoporthoz tartozó izolátumok mindig azonos variánsot hordoznak. Ez a tény a pathogén *E. coli* törzsek klonális eredetének újabb bizonyítékául szolgál.

Az α -haemolysin és a haem receptor *ChuA* közötti funkcionális kapcsolatot támasztják alá azok a kísérleteink, amelyekkel igazoltuk, hogy a két molekula expressziója az Rfah fehérje által korregulált. A reguláció mindkét esetben a transzkripció szintjén valósul meg. Az Rfah fehérje jelentősebb szükséges továbbá a tok kifejeződéséhez és az LPS szintéziséhez az *E. coli* 536' törzsben. Mivel ezek a komponensek jelentős virulencia faktorok, az Rfah fehérjét eredményeink alapján a törzs globális virulencia regulátorának tekinthetjük.

Allatkísérletes modellekben igazoltuk, hogy az izogén *rfaH* mutáns virulenciája a vad törzshöz képest szignifikánsan csökken. Bizonyítotuk továbbá, hogy a mutáns törzs aszcendáló hűgűtű fertőzés kiváltására nem képes, és a vizelettel kiütül a szervezetből. Ezen felül a mutáns attenuált voltát támasztja alá, hogy (a vad törzssel ellentétben) nagyfokú érzékenységet mutat a szérum baktericid hatásával szemben.

További kísérletek szükségesek az Rfah fehérje egyéb *E. coli* törzsek, illetve más Gram-negatív baktériumok virulenciájában játszott szerepének pontosabb megismeréséhez. Amennyiben a fehérje globális virulencia regulátor szerepe egyéb baktériumok esetén is beigazolódná, úgy specifikus blokkolása fontos szerepet játszhat a vakcina kutatásban és/vagy egy új antimikrobiális terápiás módszer kidolgozásában.

A tézisekhez kapcsolódó saját közlemények

1. Hacker, J., Blum-Oehler, G., Janke, B., Nagy, G., and Goebel, W. 1999. Pathogenicity islands of extraintestinal *Escherichia coli*. In Pathogenicity Islands and Other Mobile Virulence Elements (J.B. Kaper and J. Hacker, eds.), American Society of Microbiology, Washington D.C., pp. 59-76.
2. Hacker, J., Dobrindt, U., Janke, B., Nagy, G., Pechaczek, K., Blum-Oehler, G., Otschlager, T. 1999. Virulence factors of pathogenic *Escherichia coli*: structure, function and impact on microbial evolution. *Nova Acta Leopoldina*. 312:183-195.
3. Nagy, G., Dobrindt, U., Blum-Oehler, G., Emödy, L., Goebel, W., Hacker, J. 2000. Analysis of the hemolysin determinants of the uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. *Adv. Exp. Med. Biol.* 485:57-62. (IF: 0.513)
4. Blum-Oehler, G., Dobrindt, U., Janke, B., Nagy, G., Pechaczek, K., Hacker, J. 2000. Pathogenicity islands of uropathogenic *E. coli* and evolution of virulence. *Adv. Exp. Med. Biol.* 485:25-32. (IF: 0.513)
5. Dobrindt, U., Janke, B., Pechaczek, K., Nagy, G., Ziebhuf, W., Fischer, G., Schlotthorn, A., Hecker, M., Blum-Oehler, G., Hacker, J. 2000. Toxin genes on pathogenicity islands: impact for microbial evolution. *Int. J. Med. Microbiol.* 290:307-311. (IF: 0.599)
6. Nagy, G., Dobrindt, U., Kupfer, M., Emödy, L., Karreh, H., Hacker, J. Expression of haemin receptor molecule *ChuA* is influenced by Rfah in uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. *Infect. Immun.* 69:1924-1928. (IF: 4.204)
7. Nagy, G., Dobrindt, U., Schneider, Gy., Khan, A.S., Hacker, J., Emödy, L. Loss of regulatory protein Rfah attenuates virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* Közlésre elfogadva. (IF: 4.204)
8. Dobrindt, U., Blum-Oehler, G., Nagy, G., Schneider, G., Hartsch, T., Johann, A., Henne, A., Jeffke, T., Gottschalk, G., Hacker, J. Studies on the genetic structure and occurrence of pathogenicity island IS_{536} -TV $_{536}$ of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. Közletre közlésre benyújtva.

Előadások, poszterek

Blum-Oehler, G., Dobrindt, U., Janke, B., Nagy, G., Piechaczek, K., Hacker, J. Pathogenitätsinseln von extraintestinalen *Escherichia coli*-Bakterien: Strukturelle und evolutionäre Aspekte. DECHEMA-Jahrestagung. Wiesbaden, 1999. április 27-29.

Hacker, J., Dobrindt, U., Janke, B., Piechaczek, K., Nagy, G., Ziebuhr, W., Fischer, G., Schrierhorn, A., Blum-Oehler, G. Toxin genes on pathogenicity islands: impact for microbial evolution. ETOX meeting. Ste. Maxime, 1999. június 27-július 2.

Blum-Oehler, G., Dobrindt, U., Janke, B., Nagy, G., Hacker, J. Pathogenicity islands of uropathogenic *E. coli* and evolution of virulence. FEMS Symposium „Genes and proteins underlying microbial urinary tract infections”. Pécs, 1999. szeptember 16-19.

Nagy, G., Dobrindt, U., Blum-Oehler, G., Emődy, L., Goebel, W., Hacker, J. Analysis of the hemolysin determinants of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. FEMS Symposium „Genes and proteins underlying microbial urinary tract infections”. Pécs, 1999. szeptember 16-19.

Dobrindt, U., Blum-Oehler, G., Janke, B., Nagy, G., Piechaczek, K., Jacobi, C., Gottschalk, G., Schrierhorn, A., Fischer, G., Hecker, M., Hacker, J. Pathogenicity islands of the uropathogenic *Escherichia coli* strain 536: structural and functional aspects. DECHEMA Workshop. Frankfurt am Main, 1999. november 4-5.

Blum-Oehler, G., Dobrindt, U., Janke, B., Nagy, G., Piechaczek, K., Gottschalk, G., Hartsch, T., Johann, A., Fischer, G., Schrierhorn, A., Hecker, M., Hacker, J. The pathogenicity islands of the uropathogenic *E. coli* strain 536: structure and function. Microbiology 2000 Meeting. München, 2000. március 12-16.

Nagy, G., Dobrindt, U., Kupfer, M., Hacker, J. RfaH Regulates the Expression of Hemin Receptor ChuA in the Uropathogenic *E. coli* Strain 536. 100th General Meeting of the American Society for Microbiology. Los Angeles, 2000. május 19-23.

Blum-Oehler, G., Dobrindt, U., Janke, B., Middendorf, B., Nagy, G., Gottschalk, G., Hartsch, T., Johann, A., Hacker, J. Structural and functional analysis of the genome of the uropathogenic *E. coli* strain 536. The Millennium Symposium on Pyelonephritis and UTI. Lund, 2000. május 24-26.

Nagy, G., Dobrindt, U., Kupfer, M., Hacker, J., Emődy, L. RfaH influences expression of the hemin receptor ChuA and *in vivo* virulence of a uropathogenic *E. coli* strain. A Magyar Mikrobiológiai Társaság Naggyűlése. Keszthely, 2000. augusztus 24-26.

Nagy, G., Dobrindt, U., Schneider, G., Hacker, J., Emődy, L. Loss of the RfaH Regulator Protein Results in Reduced Serum Resistance and *in vivo* Virulence of an Uropathogenic *E. coli* Strain. 101st General Meeting of the American Society for Microbiology. Orlando, 2001. május 20-24.

Nagy, G., Dobrindt, U., Schneider, G., Hacker, J., Emődy, L. Loss of regulatory protein RfaH attenuates virulence of an uropathogenic *Escherichia coli* strain. A Magyar Mikrobiológiai Társaság Naggyűlése. Balatonfüred, 2001. október 10-12.

Nagy, G., Dobrindt, U., Blum-Oehler, G., Emődy, L., Hacker, J. Identification of a *cis*-acting regulatory element upstream of *hlyI* determinant in uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. 102nd General Meeting of the American Society for Microbiology. Salt Lake City, 2002. május 19-23.