

1. Uropathogén *Escherichia coli* fő virulencia faktorainak előfordulása beteganyagban

Uropathogén *Escherichia coli* törzseket gyűjtöttünk klinikai beteganyagokból. 250 törzs fenotípusos elemzése szerint a törzsek 53,3 %-a termel közönséges fimbriát, míg 41,2 % P-fimbria pozitív. Az izolátumok 64,0 % bizonyult alfa-hemolizin termelőnek. A vizsgálatok alapján erős pozitív korreláció mutatkozik a két legfontosabb virulencia tulajdonság, a P-fimbria hordozás és az alfa-hemolizin termelés között: a haemolysin termelő törzsek 84,7 %-a P-fimbria hordozó. A törzseknek mindössze 15,7 %-a nem rendelkezett a fenti három virulencia faktor egyikével sem. A virulencia tényezők széles skálájának genotípusos detektálásához szükséges pathochip beszerzése az eredetileg kiválasztott cégtől az ott történt személyi változások miatt nem valósulhatott meg. Ezért újabb céget kellett kiválasztanunk a chipek elkészítésére. Az ebből adódó jelentős késedelem miatt ezen vizsgálatokat még nem tudtuk befejezni, az eredményekről szükség esetén egy későbbi kiegészítő beszámolót készítünk.

2. Az alfa-haemolysin rokonsága *Escherichia* és *Proteus* fajokban

Az *Escherichia coli* és a *Proteus* fajok alfa hemolysinjeinek antigén rokonságát korábban igazoltuk. Génpróbák segítségével a *P. penneri*-ben az *E. coli* operonjához szerkezetileg hasonló haemolysin operont sikerült kimutatni. Hibridizációs és funkcionális vizsgálatokkal a rendelkezésre álló spontán haemolysin negatív *P. penneri* deléciós mutánsban a deléció helyét a hlyA és hlyB cisztronokra lokalizáltuk. Kísérleteket végeztünk annak vizsgálatára, hogy a *P. penneri*-ben a haemolysin operon pathogenitási szigeten helyezkedik-e el, de az *E. coli*-ban alkalmazott methodika ebben a baktériumban nem működött. Megemlítjük, hogy angol kutatóknak *P. morganii* rendszerben hasonlóan negatív tapasztalatokat szereztek.

3. *E. coli* pathogenitási sziget in vivo transzfere.

Escherichia coli pathogenitási sziget in vivo átvitelét a hatékony szelekciós lehetőségre tekintettel az α -haemolysin operont, mint virulencia gén csoportot tartalmazó sziget (*E. coli* 536 PAIII) transzferével kíséreltük meg. Ez a modell a megfelelően szelektív telt véresagar táptalaj használatával a szigetet átvett rekombinánsok direkt felismerését teszi lehetővé a haemolysáló tulajdonság alapján. Mivel számos *Escherichia coli* törzs az α -haemolysin determinánsokat plazmidon hordozza, e virulencia géneket hordozó plazmid önmagában is egy kromoszómától független pathogenitási szigetnek tekinthető. Donornak az *E. coli* P673 törzset választottuk, amely a haemolysin operont egy konjugatív transzferre nem képes plazmidon hordozza. Ugyanakkor a törzs egy konjugatív plazmidot is tartalmaz, amellyel a haemolysin plazmid kointegrátumot képes alkotni. A haemolysin plazmidot egy néma szekvenciában ampicillin transzpozonnal jelölve már korábban vizsgáltuk azt, hogy a helper plazmid segítségével átvihető-e egy *E. coli* K12-es törzsbe in vitro rendszerben. Mivel ez sikerült, megkíséreltük az in vivo transzfert egerek bélcsatornájában. A donor és recipiens külön-külön történő orális bevitele után a haemolysin termelő rekombinánsra irányuló megfelelő szelekciós módszerrel ki tudtuk mutatni a két plazmid együttes méretének megfelelő nagyságú ($61,6 + 114,8 = 176,4$ kilobázis-pár) kointegrált haemolysin plazmidot hordozó *E. coli* K12 származékot az egerek székletében. A haemolysin determinánsokat kromoszómális pathogenitási szigeten hordozó törzs esetében a sziget-transzfer bonyolultabb. Itt először a kromoszómából spontán kivágódó szigetnek kell egy konjugációra képes plazmidba integrálnia a transzferhez. Egy ilyen rendszer in vitro kialakulásának lehetőségét szintén korábban igazoltuk. A kromoszómális sziget in vivo transzferének első lépése a sziget excíziója a kromoszómából. Ezután egy konjugatív helper plazmiddal kointegrálódva juthat át

másik *E. coli* törzsbe. Legújabb kísérleteink szerint a kromozómából kivágódott és a helper plazmiddal integrálódott sziget in vivo is átvihető. A kísérletben az *E. coli* 536 jelzésű uropathogán törzs α -haemolysint kódoló pathogenitási szigetét transzportáltuk ilyen módon vissza ugyanezen törzsnek a szigetet elvesztett deléciós mutánsába. A deléciót szenvedett szakasz a törzsbe bevitt RP4 eredetű, chloramphenicol rezisztenciát közvetítő helper plazmiddal kointegrálódott, majd a kointegrátumot vittük át egy *E. coli* K12 törzsbe. Ezt a törzset donorként és a vad törzs szigetét elvesztett származékát recipiensként alkalmaztuk az in vivo transzfer kísérletben. A két törzset egy órással különbséggel adtuk be orálisan egereknek. A székletből történő tenyésztéskor chloramphenicollal kiegészített laktóz minimál táptalajt használtunk. A laktóz negatív donortörzset nutritív tulajdonsága, a recipienst pedig chloramphenicol érzékenysége alapján kontraszelektáltuk. A táptalajon csak a kointegrált plazmidot felvett rekombináns képes szaporodni. A végleges identifikálás a haemolytikus tulajdonság megjelenése, a recipiens immunsavóval történő azonosítása és recipiens-, valamint sziget-specifikus PCR reakciókkal történt. Az átvitel változatos kísérleti paraméterek mellett is bekövetkezett. Logaritmusos vagy stacioner fázisban lévő donor és recipiens kultúrák alkalmazása, 37 °C vagy 20 °C inkubációs hőmérséklet, 24 vagy 48 órás inkubáció egyaránt lehetővé tette a transzfert. Ugyanakkor meglehetősen magas csíraszám alkalmazása volt szükséges: donor legalább 10^9 csíra, recipiens legalább 10^8 csíra. Ilyen csíraszámok a rezervoár vastagbélben jelen lehetnek.

Összesen 166 kísérletet végeztünk, amelyekben 127 független transzkonjugánst nyertünk. A teljes PAI 116 transzkonjugánsban volt jelen, míg deléciót szenvedett PAI-t 11 transzkonjugánsban találtunk. 83 esetben a PAI a kromozómába integrálódott, a további származékokban kointegrált plazmidként a citoplazmában volt jelen.

Következő célunk a PAI visszavitele volt az eredeti hordozó törzs negatív származékába egerek bélcsatornájában. 10^9 - 10^{10} csírával alkalmazva is csak néhány transzkonjugánst nyertünk, amelyekről igazolni tudtuk biokémiai, szerológiai és PAI fajlagos DNS mintákkal igazolni tudtuk, hogy valóban recipiens törzs PAI-t felvett származékai. A haemolysin pozitív rekombinánsok virulenciájának vizsgálata is megtörtént, ascendáló húgyúti egérmódelben a haemolysin termelő rekombinánsok a nem haemolisáló avirulens recipienssekkel szemben minden esetben virulenseknek bizonyultak: 10^5 nagyságrendű csíra bevitele esetén az állatok elhullását váltották ki.

Az alacsony in vivo transzfer frekvenciára tekintettel megismételtük a kísérleteket olyan egerekben, amelyek fakultatív vastagbél flóráját előzőleg streptomycinnel kiirtottuk. A kísérleteket nem tudtuk befejezni, mert a haemolysin pozitív donor az intravazális haemolysis tüneteinek kíséretében az állatok elhullását okozta. Ez a megfigyelés az orvosi gyakorlatban is figyelemre érdemes gyakorlati jelentőséggel bírhat. Az orvosi gyakorlatban a streptomycin használata ugyan háttérbe szorult, de a mikrobiótát (bélflórát) hasonlóan befolyásoló antibiotikumokat rendszeresen használnak. A jelenség kísérletesen (Koch posztulátumok) igazolja a haemolysin szerepét azon irodalomból irodalomban közölt humán esetekben, amikor olyan személyekben alakult ki akut haemolytikus krízis, akik a bélcsatornájukban az alkalmazott antibiotikummal szemben rezisztens haemolysin termelő *E. coli* törzset hordoztak.

4. Az alfa-haemolysin operon átvitele különböző genusok képviselői között

Mivel a haemolysin operon GC aránya nem az *E. coli* (50 %), hanem a *Proteus* fajok GC arányának (38 %) felel meg, feltehetően a haemolysin operont hordozó archetípus *Proteus*

volt.. Ezért sikeres in vitro kísérletek után a haemolysin gének átvitelét megkíséreltük *Proteus* donorból *E. coli*-ba az egerek bélcsatornájában is. A transzfer, bár rendkívül alacsony frekvenciával, de in vivo is létrejön.

5. Az egyes virulencia faktorok pathogenetikai szerepének vizsgálata egérkísérletekben

Az extraintestinális *Escherichia coli* (EXPEC) virulenciájáért felelős faktorok egyenkénti szerepének vizsgálatára az egyes faktorok termelésében mutáns, illetve többszörös mutáns származékokat hasonlítottunk össze egérmodellekben. Elsődleges célunk ezen szélesebb EXPEC kategórián belül az uropathogenitást (UPEC) befolyásoló tényezők hatásának elemzése volt. Erre való tekintettel a legrelevánsabb modell az aszcendáló húgyúti fertőzés volt. Emellett intravénás és inhalációs modelleket állítottunk be. Az egyes virulencia faktorok hozzájárulása a teljes virulenciához az egyes modellekben különböző volt. Mindhárom modellben meghatározó szereppel bírt az alfa-haemolysin termelés: elvesztése esetén a származék avirulenssé vált, vagyis az egyes modellekben alkalmazható legmagasabb csíraszám (intravénásan és intranazálisan 10^8 csíra, intravezikálisan 10^5 csíra) sem okozta az állatok elhullását. A húgyúti modellben emellett a fimbria által közvetített kolonizációs készségnek és a tokképzésnek is nagy jelentősége volt. A kolonizációs P-fimbria elvesztése a letális dózis mintegy ezerszeres, a tokképzés hiánya mintegy százszoros emelkedését okozta. A jelenséget azzal magyarázzuk, hogy a kórokozónak a hólyagban először kolonizálnia kell ahhoz, hogy a vesemedencébe, a vese szöveibe, majd végül a keringésbe kerüljön a lethális uriszepszis kiváltásához. A hólyag kolonizációjában az adhéziónak és az antifogociter toknak van jelentős szerepe. A fimbria- vagy tokmentes, de haemolysin termelő mutánt közvetlenül a keringésbe juttatva viszont közvetlenül generalizált fertőzést modelleztünk, ahol a kolonizációs lépésre nincs szükség.

6. A virulencia regulációjára irányuló vizsgálatok

Korábban kimutattuk, hogy az Sfa és Prs fimbiák regulációs mechanizmusai között pozitív kölcsönhatás („cross-talk”) áll fenn. A jelen periódusban egy negatív „cross-talk” mechanizmust derítettünk fel: az Sfa fimbria regulátor génje az 1-es típusú fimbria és csillók mennyiségi expresszióját csökkenti.

Az úgynevezett nucleoid fehérjék közül a H-NS és StpA fehérjék virulenciát szabályozó szerepe ismert volt. Egy további nucleoid fehérje, a Hfp szabályozó szerepét mutattuk ki a fimbria antigének és a tok expressziójában, azaz a húgyúti kórokozó képességben. Emellett igazoltuk, hogy a Hfp fehérje a bakteriális növekedési ráta pozitív szabályozásában betöltött szerepével is hozzájárul a kórokozó virulenciájához.

7. Egyéb vizsgálatok

A pályázat célkitűzéseinek megvalósításához mindig biztonsági ráhagyással kellett rendelni az egereket. A ráhagyásból maradó egereket *Candida*, *Salmonella* és *Klebsiella* törzsek vizsgálatában hasznosítottuk.

Candida albicans stressz mutánsainak virulencia változásait írtuk le.

Salmonella regulációs mutánssal végzett vakcinációs kísérletekben vettünk részt.

Polarizációs optikai módszerrel kimutattuk, hogy *Klebsiella pneumoniae* törzsek intraperitoneális egéroltas után kettőstörésük orientációját a hasüregi macrophagokban megváltoztatják. A változás sokkal gyakoribb baktériumokban csak órákkal később következik be, mint a tok nélküli izogén mutánsokban.

Rendezvény szervezése: A Network of Excellence „EuroPathoGenomics” kiértékelő zárókonferenciáját rendeztük meg Pécsen 2010. április 24-25. között.

Megjegyzés: A publikációs jegyzékben szereplő közleményeken kívül a patogenitási szigetek transzferére vonatkozó kézirat napokon belül elkészül a Microbiology GSM folyóirathoz, a pathochip vizsgálatok kiértékelése után még egy további közlemény készítése várható.