

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**Virulencia gének regulációja uropathogén *Escherichia coli*-ban**

**Dr. Nagy Gábor**

**Pécsi Tudományegyetem  
Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézete**

**Témavezető: Dr. Emőd Levente**

**Pécs, 2002**

## 1. Bevezetés

### 1.1. Uroinfekciók

A húgyúti fertőzések a fejlett országok leggyakoribb fertőző betegségei közé tartoznak. Élete során minden második nő legalább egyszer átesik húgyúti fertőzésen. 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 húgyúttakat érinti (pyelonephritis), veleszületett vagy szerzett hajlamosító tényező áll fenn, immunszuppresszió és immundeficiencia esetén, valamint ha terhesekben vagy férfiakban alakul ki a betegség. Ide sorolhatjuk továbbá a megszokott kezelési stratégiára rezisztens és a visszatérő (relapszus vagy reinfekció) fertőzéseket. A terápiára rezisztens és/vagy rekurrens fertőzések septicaemiához, krónikus pyelonephritishoz, végső esetben pedig veseelégtelenséghez vezethetnek. A haemodialízis ill. vesetranszplantáció egyik gyakori indikációja a krónikus pyelonephritis következtében kialakult veseelégtelenség. 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 nosocomialis fertőzések közel feléért. A húgyúti fertőzések túlnyomó többsége (>95%) ún. aszcendáló fertőzés, vagyis a beteg a saját bélflórájából származó baktériummal fertőződik. A húgyúti pathogén *E. coli* törzsek olyan virulencia faktorokkal rendelkeznek, amelyek lehetővé teszik a baktérium túlélését, kolonizációját és invázióját a húgyúton belül, vagyis felelősek a törzs urovirulenciájáért. A virulencia faktorokat kódoló géneket a kórokozó törzsek horizontális géntranszfer során bakteriofágok, plazmidok vagy pathogenitási 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. Ezeken kívül fontos a szérumbaktericid

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

Mivel a virulencia faktorok egyrészt specifikusak a pathogén törzsekre (vagyis a kommenzális bélflóra törzsek többségében nincsenek jelen), másrészt a fertőzés létrejöttéhez ép húgyúti rendszer esetén elengedhetetlenek, ezért a jövőbeli antimikrobiális terápia célpontjául szolgálhatnak. Emellett a virulencia faktorok elleni immunválasz erősítése kivédheti a fertőzés kialakulását. Kimutatták, hogy kevésbé fogékonyak húgyúti fertőzéssel szemben azok az egyének, akiknek szérumában 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 hátráltathatja a fertőzés „normális” menetét. A virulencia faktorok expressziója jellemzően csak a gazdaszervezetben detektált különböző szignálok hatására indul be. Ilyen paraméterek a hőmérséklet, pH, oszmolaritás, vasszegény környezet, stb. Ezek a hatások különböző specifikus vagy globális regulátor gének átírását indukálják, amelyek a virulencia gének expresszióját szabályozzák.

A virulencia faktorok egymásra utaltak, hatásukat kooperációban fejtik ki. Ebből következik, hogy egyetlen virulencia gén akvirálása nem tesz pathogénné egy különben apathogén törzset. Fordítva; egy pathogén törzs egyetlen virulencia faktorának inaktíválása 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 inaktíválása általában bizonyos virulencia faktorok expressziójának csökkenéséhez, 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 pathogenitási szigetet hordoz a kromoszómáján, amelyeken számos virulencia faktor génje helyezkedik el. A törzs két  $\alpha$ -haemolysin determináns mellett, P related-, S-, type 1- és curli fimbria szintéziséért felelős operonokkal rendelkezik. Legalább két különböző sziderofór rendszert szintetizál, valamint a közelmúltban leírt haemin receptor (ChuA) molekulával is rendelkezik. A törzs virulenciája számos egér modellben bizonyítást nyert. Egy kozmid génbank specifikus átfedő klónjainak segítségével a négy ismert pathogenitási 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 $\alpha$ -haemolysin expressziójának vizsgálata

Az  $\alpha$ -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.

Hogy nagyobb betekintést nyerjünk az  $\alpha$ -haemolysint kódoló operon expressziójának szabályozásába, a következő stratégiát követtük:

- ♦ Az *E. coli* '536' mindkét *hlyCABD* operonja (*hlyI* és *hlyII*) pathogenitási szigeten helyezkedik el, amelyek spontán deléciója *hlyI* ill. *hlyII* mutáns törzsek létrejöttét eredményezi. Ezen törzsek haemolytikus 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 klónok 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 kicseréljük.
- ◆ A klónozott *hly* operonok által meghatározott *in vitro* és *in vivo* mért haemolytikus aktivitás, valamint az intracelluláris és szekretált toxin mennyiségének meghatározása lehetővé tenné a két determináns által kódolt eltérő aktivitás háttérének tisztázását.

## 2.2. RfaH fehérje mint virulencia regulátor vizsgálata

Az  $\alpha$ -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  $\alpha$ -haemolysin toxin a gazdasejtek destruálása révén a baktériumokat különböző tápanyaggal (pl. vastartalmú haemmel) látja el, ezért funkcionális kapcsolatban áll a közelmúltban leírt külső membrán fehérjével, a haemin receptor ChuA molekulával. Feltételeztük, 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*<sub>536</sub> 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 bizonyíttására terveztük:

- ◆ Különböző virulencia faktorok (tok, LPS, sziderofórok, fimbriák, csilló és  $\alpha$ -haemolysin) mennyiségi, szerkezeti ill. funkcionális összehasonlítását vad törzs és izogén *rfaH* mutánsa esetén.
- ◆ Az *rfaH* mutáns csökkent virulenciájának kimutatását különböző állatkísérletben.

### 3. Módszerek

#### 3.1. Baktériumtörzsek

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

#### 3.2. Táptalajok és tenyésztés

Az Oxoid, Difco és Biolab cégek portáptalajait használtuk 1,5% agar hozzáadásával vagy anélkül. A véresagar 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 kromozómális DNS *Sau3AI* restrikciós endonukléázzal történő emésztése után a fragmentumokat a SuperCos-1 kozmid vektor kompatibilis hasítási helyére (*BamHI*) klónoztuk.  $\lambda$  fág partikulumokba történő *in vitro* csomagolás után a rekombináns kozmidokat az *E. coli* XL-1 Blue laboratóriumi törzsbe transzdukció által 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 primereken elhelyezett restriktions 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 $\alpha$  törzsbe transzformáltuk a CaCl<sub>2</sub> módszerrel.

### 3.6. Haemolysin teszt

Mosott 1%-os humán vörösvértest szuszpenzióhoz különböző törzsek logaritmusos fázisban lévő 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 blottoltuk, majd a kérdéses fehérjét specifikus szérummal és jelölt szekunder antitesttel luminográfia segítségével detektáltuk.

### 3.8. Southern és Northern blot

A tisztított kromozómális DNS-t *Bgl*II enzimmel 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 blottoltuk, majd jelölt specifikus PCR termékkel hibridizáltuk. A hibridizált nukleinsavat röntgen filmen luminográfiával tettük láthatóvá.

### 3.9. LPS analízis

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

### 3.10. Tokantigén kimutatása ELISA módszerrel

A baktériumokat ( $10^9$  CFU/ml) éjszakán át kötöttük ki ELISA lemezhez. Az általunk termelt tok-elleni (K15) savó és HRPO-jelölt anti-nyúl immunglobulin felhasználásával határoztuk meg a termelt tokantigén mennyiségét.

### 3.11. Sziderofór teszt

A sziderofórok által megkötött vas mennyiségét a Chrome Azurol S (CAS) teszt segítségével vizsgáltuk. Minimál tápoldatban felnövesztett baktérium szuszpenziót 3 órán keresztül különböző végkoncentrációjú (0,1-0,4 mM) 2,2' dipirydyllal (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  $\mu$ l mosott bakteriális szuszpenziót ( $10^6$  CFU/ml) inkubáltunk egyenlő mennyiségű normál humán szérum hozzáadása után 37 °C-on. Mintákat vettünk 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  $\alpha$ -haemolysin által kiváltott haemorrhagiás tüdőödémában pusztulnak el, így az elhullás arányából az *in vivo* szekretált toxin mennyiségére következtethetünk. A vizsgálatot a Hacker és mtsai által leírt módon végeztük.

### 3.14. Ascendáló húgyúti fertőzés egérben

3-4 napos egereket közvetlenül a hasfalon keresztül intravezikálisan fertőztünk. A túlélőket a fertőzést követő 21. napon feláldoztuk és meghatároztuk a kórokozó csíraszámát a vérben, 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 antibiotikum szelekciós markerrel rendelkezik a vad törzshöz képest, ami lehetőséget adott mindkét törzs csíraszámának külön-külön



meghatározására. A vizelettel való ürítésüket 20 napon keresztül követtük a hígított vizelet-minta megfelelő antibiotikumokat tartalmazó agar lemezeken történő tenyésztése segítségével. Három hét elteltével a túlélő egerekben mindkét törzs csíraszámát meghatározzuk a fent leírt szervekből.

## 4. Eredmények

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

A haemolysin operonokat kódoló pathogenitási szigetek elvesztése (PAI I<sub>536</sub>, ill. PAI II<sub>536</sub>) olyan deléciós mutánsokat eredményezett, amelyek *in vitro* haemolytikus aktivitása jelentősen eltért egymástól. A PAI II<sub>536</sub> elvesztése csak mintegy 60%-ra (nem szignifikáns mértékben) redukálta a haemolytikus aktivitást, ezzel szemben a PAI I<sub>536</sub> deléciója 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 eltértek. 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 relatíve 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 fúzionáltuk a másik operon struktúrgénjeivel és *vice versa*. Ezen klónok által termelt  $\alpha$ -haemolysin toxin mennyiségét meghatározva azt tapasztaltuk, hogy a klónozott *hlyI* determináns expressziója lényegesen meghaladja a *hlyII*-ét, mivel a Western blottal detektált HlyA mennyisége mind intracellulárisan, mind a felülúszóban lényegesen nagyobb volt a *hlyI* determinánst hordozó klón esetében. A *hlyI*

leader szekvenciájának fúziója a *hlyII* struktúrgénekkal 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 HlyA toxin lényegesen magasabb biológiai aktivitást mutatott, mint a másik operonról kifejezett HlyA. 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 egér modellben (tüdő toxicitási teszt) 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 azonosítása

A *hlyI* operont különböző hosszúságú leader szekvenciával együtt pUC18 vektorba klónoztuk. Az 500 és 1000 bp leader szekvenciát tartalmazó klónokból származó HlyA mennyisége alacsonyabb volt mint a hosszabb 5' régiót tartalmazó klónok esetén. Ezzel szemben az *in vitro* (haemolysin teszt) és *in vivo* (tüdő toxicitási teszt) meghatározott biológiai hatás szignifikánsan magasabb volt a rövidebb leader szekvenciát tartalmazó klónok esetén. A kérdéses régióban található potenciális ORF-t klónoztuk és az így kapott kompatibilis plazmidot a rövid leader szekvenciát tartalmazó rekombináns *hlyI* plazmidokkal kotranszformáltuk. A klónozott ORF azonban nem váltotta meg a *hlyI* plazmidból származó haemolytikus aktivitást, így egy *trans*-módon ható *hlyI* regulátor helyét azonosítani nem tudtunk kizártuk.

#### 4.5. Az $\alpha$ -haemolysin toxin és a haem receptor ChuA molekula expressziója együttesen regulált az RfaH transzkripció regulátor fehérje által

Irodalmi adatokkal összhangban azt találtuk, hogy az *rfaH* gén null-mutációja a haemolytikus aktivitás szinte teljes megszűnését eredményezi az *E. coli* '536' törzs esetén. Kimutattuk, hogy a haemin receptor ChuA molekula (amely a gazdasejtek lízise során felszabaduló haem molekulák révén a baktériumok vassal való ellátását segíti elő, így az  $\alpha$ -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*<sub>536</sub> gén szekvenálása során azonosítottuk az ún. JUMPStart 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 pathocsoporthoz tartozó *E. coli* törzsben

A *chuA*<sub>536</sub> gén nukleotid szekvenciája nagyfokú hasonlóságot mutat a korábban szekvenált enterohaemorrhagiás *E. coli* (EHEC) eredetű *chuA*<sub>EDL933</sub> 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 fragmentumon található, ezért feltehetően a géneket határoló régiók is különbözőek. A két eltérő variáns előfordulásának vizsgálatára Southern hibridizációt végeztünk 44, különböző pathocsoporthoz tartozó *E. coli* törzssel. A kapott eredmények azt bizonyítják, hogy az '536'-os variánst hordozza az összes általunk vizsgált uropathogén (UPEC) 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 enteroaggregatív (EAaggEC), az enterotoxikus (ETEC), és az O157-től eltérő szerocsoportú EHEC izolátumok 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  $\alpha$ -haemolysinre és haem receptorra kifejtett hatáson kívül az RfaH hiánya az II-es típusú poliszaharid tok kifejeződésének csökkenéséhez vezetett. Az LPS szerkezetében az O-specifikus oldalláncok hiányát mutattuk ki az *rfaH* mutánsban, vagyis az RfaH elvesztése ún. 'R' fenotípust eredményezett. A csilló, különböző fimbriák és sziderofórok expressziójában nem találtunk különbséget a vad törzs és izogén *rfaH* mutánsa viszonylatában. Összefoglalva: az RfaH fehérje szükséges az  $\alpha$ -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 szérumban rezisztencia megszüntetéséhez vezet

Az uropathogén izolátumokra jellemző virulencia paraméter, hogy rezisztensek a normál szérumban baktericid hatásával szemben. Az *E. coli* '536' vad törzs 4 órás inkubálás során nemcsak túlél, 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 szérumban baktériumölő hatásával szemben.

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

Aszcendáló húgyúti egér modellt használtunk annak bizonyítására, hogy a fent említett virulencia faktorok csökkent expressziója az *rfaH* mutáns esetében az *in vivo* virulencia tényleges attenuálását eredményezi. A modellben a vad törzssel való fertőzés során 100%-os lethális dózist kiváltó dózis az *rfaH* mutáns esetében csak 18%-os elhullást eredményezett.

A koinfekciós modellben bizonyítottuk, hogy a mutáns törzs a hólyagba való befecskendezés után kiürült a vizelettel, míg a vad törzs ürített csíraszámában nem csökkent lényegesen 20 napon keresztül. A 21. napon történt boncolás alkalmával a vad törzset a vesékből is magas csíraszámokban tudtuk visszatenyésztetni, 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 kitenyésztetni azt bizonyítja, hogy az RfaH fehérje hiányában az egyébként nephrovirulens törzs nem képes aszcendáló húgyúti fertőzést kiváltani.

### 5. Összefoglalás és következtetések

A virulencia faktorok egy species virulens törzseivel asszociált járulékos sejt-komponensek, amelyek elősegítik a fertőzés létrejöttét és a betegségre jellemző tünetek kialakulását. A fajlagosan ellenük irányuló védekezés a fertőzések elleni beavatkozások egyik ígéretes lehetőségét kínálja, hiszen ily módon szelektíven a patogén 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  $\alpha$ -haemolysin toxin az uropathogén *Escherichia coli* egyik legfontosabb virulencia faktora, amelyet irodalmi adatok szerint a vesét is érintő fertőzésekből 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 *hlyII* 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 második *hly* determináns hordozásának.

Az  $\alpha$ -haemolysin a gazdasejtek destruálása 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 felvételéért felelős külső membrán proteint a közelmúltban írták le. Igazoltuk, hogy a haemin receptort kódoló *chuA* génnek két variánsa létezik, amelyek a határoló szekvenclákban különböznek. A két változat a különböző megbetegedést okozó törzsekben szabályos elrendeződést mutat, vagyis az azonos pathocsoporthoz tartozó izolátumok mindig azonos variánst hordoznak. Ez a tény a pathogén *E. coli* törzsek klonális eredetének újabb bizonyítékául szolgál.

Az  $\alpha$ -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 koregulált. A reguláció mindkét esetben a transzkripció szintjén valósul meg. Az RfaH fehérje jelenléte 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.

Állatkísérletes modellekben igazoltuk, hogy az izogén *rfaH* mutáns virulenciája a vad törzshöz képest szignifikánsan csökken. Bizonyítottuk továbbá, hogy a mutáns törzs aszcendáló húgyúti fertőzés kiváltására nem képes, és a vizelettel kiürül 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 beigazolódik, 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., Piechaczek, K., Blum-Oehler, G., Ötschlager, 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., Piechaczek, 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., Piechaczek, K., Nagy, G., Ziebuhr, W., Fischer, G., Schierhorn, 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., Karch, 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 I<sub>336</sub>-IV<sub>336</sub> of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. Kézirat közlésre benyújtva.

## Előadások, posztterek

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., Schlierhorn, 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., Emödy, 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. 100<sup>th</sup> 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 Millenium Symposium on Pyelonephritis and UTI. Lund, 2000. május 24-26.

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

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

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

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