

**Szent István Egyetem  
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola**

**A baromfi *Salmonella* Enteritidis elleni korai védelmet szolgáló  
törzsek előállítására virulencia plazmidra és flagellin rendszerre  
irányuló mutagenézissel**

**Doktori értekezés tézisei**

Készítette:

**Imre Ariel**

**MTA Állatorvos-tudományi Kutatóintézet**

**2007**

Szent István Egyetem

Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

Témavezető:

Prof. Dr. Nagy Béla, MTA rendes tagja

MTA Állatorvos-tudományi Kutatóintézete, Budapest

Konzulens:

Dr. Olasz Ferenc

Mezőgazdasági Biotechnológiai Központ, Gödöllő

## Bevezetés

A háziállatok szalmonellózisa elleni védekezés egyik eszköze a vakcinázás, melynek a modern baromfitartásban alig két évtizedes múltja van. Bár az eddigiekben kifejlesztett vakcinákra vonatkozó kísérleti adatok általában kedvezőek, a baromfi szalmonellózis elleni vakcinák továbbfejlesztése még számos vonatkozásban szükséges. Így hatékonyságuk miatt egyre inkább az élő, orális *Salmonella* elleni vakcinák kerülnek előtérbe az elölt vakcinákkal szemben. A védekezésre használt törzseknek azonban számos biztonsági követelménynek kell megfelelniük: ártalmatlannak kell lenniük a gazda szervezetre és a környezetre, de legalább ennyire fontos az is, hogy a vad törzsektől egyértelműen elkülöníthetőek legyenek.

Munkánk során ezeket a szempontokat szem előtt tartva egy negatív fehérje markerrel ellátott, virulenciájában csökkentett *Salmonella* Enteritidis vakcina jelölt törzset terveztünk előállítani, amely alkalmas lehet a napos baromfi *Salmonella* fertőzésekkel szembeni korai védelmére. Elsőként a vad törzsektől való gyors elkülöníthetőség érdekében szerológiai markerrel próbáltuk ellátni a vakcina jelölt törzset, melynek legegyszerűbb módja, ha egy jó antigenitású sejtfelszíni fehérjét eliminálunk a vakcinajelölt törzsről. E célból megfelelőnek tűnt a *Salmonella* Enteritidis esetében a flagellin fehérjét megcélozni, nem csak jó antigenitása – és ezáltal szerológiai ellenőrizhetősége - miatt, hanem azért is, mert monofázisos szerovariánsról lévén szó, az egyetlen flagellin gén esetleges kiütése nem mozgó fenotípust eredményez, makroszkópiusan vizsgálható markerrel látva el a törzset. A feladatot egy új megközelítéssel – az irányított transzpozícióval – terveztük végrehajtani.

A vakcinajelölt törzs virulenciáját a *Salmonella* virulencia plazmid kiűzésével terveztük csökkenteni, mely jelentős szerepet játszik a baktériumnak a gazda szervezetben való fennmaradásában és szaporodásában. A plazmidon számos, a virulenciával összefüggő géncsoport található, melyek közül talán legjelentősebb az immunsejtekben való bakteriális túlélést segítő *spv* (*Salmonella* plasmid virulence) régió, de a bélhámsejtekhez való adhézióban szerepet játszó *pef* (plasmid encoded fimbriae) operon, vagy a komplement rendszerrel szembeni rezisztenciát biztosító *rck* (resistance to complement killing) gén funkciója is jelentős lehet a fertőzési folyamatban. Ezért a plazmid végleges eliminálása egy esetleges élő, orális *Salmonella* vakcina törzs fejlesztésében is fontos lépést jelenthet.

Munkánk utolsó szakaszaként a *S. Enteritidis* 11 jelű törzs transzpozon alapú molekuláris genetikai módszerekkel előállított mutánsainak virulencia tulajdonságait és korai védő hatását vizsgáltuk *in vitro* és *in vivo* körülmények között.

## Célok

Munkánk fő célja olyan transzpozon mutagenézis rendszerek kidolgozása és kipróbálása, melyek segítségével *Salmonella* Enteritidis törzsek markerezése és virulencia csökkentése érhető el, távlati vakcina fejlesztések céljából. Részletesebben:

1. A *Salmonella* Enteritidis és néhány egyéb érdekes szerovariáns törzseinek PCR-es vizsgálata flagellin termelés és flagellin fázisváltás szempontjából.
2. *Salmonella* flagellin génekre kidolgozott irányított transzpozon-mutagenézis rendszer létrehozása és működésének vizsgálata annak érdekében, hogy flagella mentes, ezáltal markerezett vakcinajelölt törzset állítsunk elő.
3. A markerezett törzs virulenciájának csökkentése a virulencia plazmid kiűzésével.
4. Az így előállított *Salmonella* Enteritidis vakcina jelölt törzsek korai védőhatásának vizsgálata.

## A kísérletes munka ismertetése

A disszertációban tárgyalt kísérletek során arra törekedtünk, hogy olyan, a naposcsibék korai védelmét szolgáló, vakcina jelöltként szóba jöhető törzseket állítsunk elő, melyek szerológiai megkülönböztetésre is alkalmas markerrel rendelkeznek, s a bélben egy időre megtelepedve, ott hatékony korai védelmet nyújtsanak, ugyanakkor virulenciájukban megfelelően gyengítettek legyenek.

Markerezés céljából kézenfekvőnek látszott a *S. Enteritidis* törzsek csillóinak (flagelláinak) „bénítása”, melyhez előbb meg kellett ismernünk a *Salmonella* flagellin gén rendszer feltérképezésének lehetőségeit. Ennek során PCR-es tesztelő rendszert dolgoztunk ki a *Salmonella* flagellin fázisváltó rendszer fontosabb elemeire. Nagyszámú *S. Enteritidis* törzs PCR-es tesztelése után megerősítettük, hogy a szerovarra jellemző H1 monofázis oka, hogy e törzsekből mindig hiányzik a H2 fázisért felelős *fljB* gén, és a teljes fázisváltó rendszer (*hin*, *hixL*, *hixR*). Jelen van azonban a *fliC* flagellin gén (és annak operátor szekvenciája), amely a H1-es flagellint folyamatosan termeli.

Az így szerzett ismeretek és a PCR rendszer segítségével a *S. Enteritidis* *fliC* gén célzott bénítását igyekeztünk elérni. E célból egy irányított transzpozíciós rendszert hoztunk létre, mely a transzpozon inszerciókat a flagelláris génekre koncentrálja. Ennek lényege volt, hogy a kiválasztott *S. Enteritidis* törzsbe egy plazmidot juttattunk, melynek IS30-FljA (IS30 transzpozázhoz kapcsolt FljA flagellin represszor) fúziós fehérje terméke a flagellin génekben mutációkat okozva azok működését blokkolja. A módszer azon a feltételezésen alapul, hogy a fúziós transzpozáz FljA része a (*fliC* operátorra) specifikus DNS kötő képessége révén az operátor környezetében – a flagellin génekben – okoz nagy gyakorisággal inszerciókat. Az így összeállított rendszerrel valóban sikerült a flagella termelést leállító mutációt végrehajtani, bár a mutációk nem a *fliC*, hanem a szomszédos *fliD* flagelláris génben következtek be. Az így előállított és további vizsgálatokra kijelölt „flagella bénított” mutánsok stabilan mozgásképtelenek (non-motilisak) lettek, a flagella termelés hiánya miatt pedig egy negatív markerrel rendelkeztek.

A következő feladat a már markerezett, nem-mozgó *S. Enteritidis* törzsek szerovar specifikus virulencia plazmidjának eltávolítása volt. E célból elsőként a hagyományos, etídium-bromidos plazmidúzési eljárást alkalmaztuk. Kezdeti kísérleteink azonban - feltehetően a plazmid nagy

stabilitása miatt - nem jártak sikerrel. Ezért a plazmid kiűzésére egy új IS10-IS30 kombinált transzpozíciós rendszert dolgoztunk ki. Ennek működése során a reaktív (IS30)<sub>2</sub> IR végeket is hordozó IS10 transzpozonnak a *S. Enteritidis* virulencia plazmid *spv* régiójába való beépülését követően, az összekapcsolódott IS30-eredetű IR végek aktiválására (egy hordozó plazmidról termelődő) IS30 transzpozáz fehérjét vittünk be. Az aktív IS30 transzpozáz az általa felismert (IS30)<sub>2</sub> IR végeket használva kiindulási pontként különböző genetikai átrendeződéseket, köztük deléciókat hajthat végre, melyek az IR végeket hordozó virulencia plazmid elvesztéséhez vezethetnek. Az új plazmidűzési módszer a kiválasztott nem mozgó *Salmonella* Enteritidis 2102 törzs esetében hatékonyan működött. A kezelés hatására a vizsgált mutánsok több mint 50%-a virulencia plazmidját elvesztette. Módszerünknek előnyös tulajdonsága, hogy számos olyan mutánst is eredményezett, amely ugyan nem vesztette el virulencia plazmidját, de azon kimutatható deléciót szenvedett. Ezzel a teljes plazmidot elveszített, vagy csonkolt virulencia plazmiddal rendelkező, deléciós változatokat állítottunk elő.

Ezek után felmerült a kérdés, hogy az elvégzett genetikai változtatások (flagellin bénítás és plazmid űzés), milyen változásokat hoztak létre a vakcina jelölt törzsek *in vitro* és *in vivo* mérhető virulenciájában (sejt-invázióban ill. bél kolonizációban és a szervi invázióban). *In vitro* a sejt-inváziós készség jelentős csökkenését tapasztaltuk. Az *in vivo* mérhető virulencia vizsgálatok céljából SPF minőségű napos csibéket fertőztünk a szülő törzssel és a vakcina jelölt nem mozgó és plazmid mentes nem mozgó törzsekkel, majd öt nap elteltével vizsgáltuk a törzseink invázióját a kísérleti állatok szerveiben (májban és lépben), valamint a csibék vakbelében elért *Salmonella* titert. Tapasztalataink alapján a vakcina-jelölt mutánsok szerv-inváziós készsége függött a fertőzési dózistól, de a szülőhöz képest jelentősen csökkent, míg a bél kolonizációs képesség tekintetében a mutánsok a szülő törzstől alig különböztek. Ez számunkra tulajdonképp kedvező eredmény volt, mivel a vakcina törzsek bélbeni megtelepedése az eredményes immunizálás egyik fontos feltétele, ugyanakkor a szervi invázió lényeges csökkenése a megbetegítő készség csökkenését jelezte.

Miután mutánsaink a rövid távú naposcsibe modell kísérletekben csökkent invázivitást mutattak, szükségesnek láttuk egy hosszabb időtartamú kísérlet keretein belül is megvizsgálni ártalmatlanságukat és korai védelmet nyújtó képességüket. Ennek érdekében ismét frissen kikelt naposcsibéket fertőztünk a vakcina jelölt SEΔ155 és – kontrollként – a szülői SE11 törzssel, majd egy nappal később a virulens *S. Enteritidis* 147-tel, mint challenge (ráfertőző) törzssel kezeltük az állatokat. Ezen kísérletek eredményeit vizsgálva megállapítottuk, hogy

egyszeri alkalmazással a ráfertőző vad virulens törzs szerv inváziójával szemben a mutáns SEΔ155 a szülő törzshöz hasonló mértékű, jelentős korai védelmet nyújtott.

Az első lépésben kitűzött célokat tehát elértük: negatív markerrel rendelkező szerv inváziós virulenciájukban csökkentett, de a bél kolonizációs készséget megtartó *S. Enteritidis* mutánsokat állítottunk elő, melyek korai védelmet nyújtó képessége a szülő törzshöz hasonlóan jelentős maradt.

A fenti célok eléréséhez vezető transzpozon alapú módszereket (flagellin bénítás, plazmid üzés) az eddigi irodalmi adatok alapján – mások által nem közölt és e célból nem alkalmazott – új módszereknek tekintjük.

## **Tézisek**

Munkánk során, amely molekuláris markerrel ellátott, élő, orális *Salmonella* Enteritidis vakcina jelölt törzsek molekuláris biológiai eszközökkel való előállítását célozta, a következő, nemzetközileg is új eredményeket értük el:

PCR-es tesztelő rendszert terveztünk, amely alkalmasnak bizonyult *Salmonella* törzsek flagellin termelő génjeinek és a flagellin fázisváltó rendszer elemeinek vizsgálatára. E módszerrel megerősítettük, hogy a *Salmonella* Enteritidis törzsek flagellin fázisváltásra való képtelenségének oka, hogy azokból mindig hiányzik a salmonellákra jellemző fázisváltó rendszer és csak a *fliC* gén, valamint annak operátor szekvenciája van jelen.

Annak érdekében, hogy a vakcina jelölt törzseinket molekuláris markerrel lássuk el, irányított transzpozon-mutagenézis rendszert dolgoztunk ki a *Salmonella* flagellin génekre. Ennek során a flagellin represszor *fljA* gént fúzionáltattuk az IS30 transzpozáz génjével, majd az így létrejött IS30-FljA fúziós fehérje működését a *Salmonella* Enteritidis 11 jelű törzsünkben

vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy a fúziós transzpozáz nagyobb gyakorisággal okoz mutációkat a *fliC* operátor célszekvencia környezetében, mint a vad típusú IS30 transzpozáz.

A hagyományos módszerekkel nehezen kiűzhető, nagyméretű *Salmonella* virulencia plazmid kiűzésére új, transzpozon alapú eljárást dolgoztunk ki. A módszer *Salmonella* Enteritidisben nagy (50% feletti) virulencia plazmid üzési gyakorisággal működött.

Az előállított nem mozgó (SE2102) valamint „virulencia plazmid mentes, nem mozgó” (SEΔ155) *Salmonella* Enteritidis 11 származékok virulencia tulajdonságait *in vitro* (sejtkultúrán), és *in vivo* körülmények között (naposcsibe modellen) vizsgáltuk. A szülő törzshöz képest mind a SE2102, mind a SEΔ155 mutáns *in vitro* sejt inváziós képessége igen jelentősen csökkent. Szintén csökkent *in vivo* körülmények között a mutánsok naposcsibe szerv inváziós képessége, míg a vakbélben elért élő csíraszámok nem változtak jelentősen a szülő SE 11-hez képest.

A SE11 törzs egyik, virulencia plazmid mentes, nem mozgó mutánsának korai védekező képességet stimuláló hatását vizsgálva megállapítottuk, hogy egyszeri alkalmazással a ráfertőző vad virulens törzs szerv inváziójával szemben a szülő törzshöz hasonló mértékű, jelentős, az élet első négy hetében jól érvényesülő korai védelmet nyújtott.



## Tudományos publikációk

### Közlemények:

1. Nógrády N., **Imre A.**, Rychlik I., Barrow P.A., Nagy B. (2003): Growth and colonization suppression of *Salmonella enterica* serovar Hadar *in vitro* and *in vivo*. FEMS Microbiology Letters 218:127-133.
2. Nógrády N., **Imre A.**, Rychlik I., Barrow P.A., Nagy B. (2003): Genes responsible for anaerobic fumarate and arginine metabolism are involved in growth suppression of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium *in vitro*, without influencing colonisation inhibition in the chicken *in vivo*. Veterinary Microbiology 97:191-199.
3. **Imre A.**, Olasz F., Nagy B. (2005): Development of a PCR system for characterisation of *Salmonella* flagellin genes. Acta Veterinaria Hungarica 53:163-172
4. **Imre A.**, Olasz F., Kiss J., Nagy B. (2006): A novel transposon-based method for elimination of large bacterial plasmids. Plasmid 55: 235-241.

### Konferencia kiadványok:

1. Nógrády N., **Imre A.**, Rychlik I., Barrow P. A., Nagy B. (2002): Lack of serovar specificity in quorum-sensing growth inhibition by *Salmonella* Hadar. Colin, P., Clément G., I3S International Symposium on *Salmonella* and Salmonellosis Proceedings, p221-222.
2. Nógrády N., **Imre A.**, Nagy B. (2000) Growth inhibition studies on *Salmonella* Typhimurium under strict anaerobic conditions. 1st Joint Meeting of Slovenian Society for Microbiology and of Hungarian Society for Microbiology., Keszthely, B-13.
3. Nógrády N., **Imre A.**, Nagy B. (2001) Interbakteriális gátló szignálok *Salmonella* populációkban Magyar Zoonózis Társaság, Szent-Iványi Binder Napok, Tihany, Előadások p141-143., Előadás

4. **Imre A.**, Nógrády N., Rychlik I., Barrow P. A., Nagy B. (2002): *Salmonella* Hadar 18 transzpozon-mutánsok jellemzése növekedésgátlási és virulencia tulajdonságok tekintetében Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, Balatonfüred Előadás kivonatok, Előadás B-17.
5. **Imre A.**, Olasz F., Nagy B. (2003): Comparative studies on genes involved in flagella production in different *Salmonella* serovars. Abstract Book FEMS Congress of European Microbiologists, Ljubjana, Slovenia, p455 (p13-8)., Poszter
6. **Imre A.**, Olasz F., Nagy B. (2003): A genetikai markerezés feltételei *Salmonella* vakcina jelölt törzseken. Magyar Zoonózis Társaság, Szent-Iványi Binder Napok, Eger Előadások 10. kötet p74-77., Előadás
7. **Imre A.**, Olasz F., Nagy B. (2003): PCR-mapping of selected *Salmonella* genotypes and serotypes for their flagellar systems. Abstracts of 14<sup>th</sup> Intern.Congr., Hung. Soc. Microbiol., Balatonfüred, B37., Előadás
8. **Imre A.**, Olasz F., Nagy B. (2004): *Salmonella* Enteritidis törzsek célzott transzpozon –mutagenézise s a mutánsok geno- és fenotípusának vizsgálata. Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, Keszthely Előadás kivonatok 50. old., Előadás
9. **Imre A.**, Olasz F., Nagy B. (2004): *Salmonella* Enteritidis flagellin mutánsok előállítására irányított mutagenézissel. Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztálya 9. Munkaértekezlete, Sopron, Előadás és poszter kivonatok, GP2, 99. old., Poszter
10. **Imre A.**, Olasz F., Nagy B. (2006): Use of IS30 elements in gene targeting system for *Salmonella*. 58. Tagung der Deutschen Gesellschaft für hygiene und Mikrobiologie, Würzburg, International Journal of Medical Microbiology 296S3 Supplement 42 September 2006 p.87, Poszter

## Köszönetnyilvánítás

Őszintén köszönöm témavezetőmnek, **Nagy Béla** akadémikus úrnak, hogy lehetővé tette munkámat a témacsoportban és tudásával, tapasztalatával segítette disszertációm elkészítését, valamint konzulensemnek, **Olasz Ferencnek**, aki bevezetett a molekuláris genetika világába, és tudásával, ötleteivel gazdagította munkámat.

Köszönöm témacsoportunk összes munkatársának, **Puruczki Istvánnénak, Tóth Istvánnak, Fekete Péter Zsoltnak** és **Malik Annának** hogy munkájukkal és hasznos tanácsaikkal segítették dolgozatom elkészültét. Külön köszönöm **Szmolka Amának** az *in vitro* inváziós és expressziós vizsgálatok által nyújtott jelentős segítségét.

Köszönetet szeretnék mondani továbbá **Szabó Móninak, Kiss Jánosnak, Nagy Zitának** és az MBK teljes Transzpozon csoportjának.

Köszönöm **Nógrády Noéminek** kezdeti biztatását és szakmai tanácsait.

Köszönet illeti az MTA Állatorvos-tudományi Kutatóintézetének vezetőit, munkatársait segítségükért és munkájukért.

Munkánkat anyagilag az NKFP 4/040/2001 (és ezen belül a Ceva-Pylaxia Zrt.) támogatta.