

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

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

PhD értekezés

Készítette:

Imre Ariel

MTA Állatorvos-tudományi Kutatóintézet

2007

Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

Témavezető:

.....

Prof. Dr. Nagy Béla
MTA Állatorvos-tudományi Kutatóintézete, Budapest

Konzulens:

.....

Dr. Olasz Ferenc
Mezőgazdasági Biotechnológiai Központ, Gödöllő

Készült 8 példányban. Ez a 8. sz. példány.

.....

Imre Ariel

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	6
Összefoglalás	7
1. Irodalmi áttekintés és célok	8
1.1. <i>Salmonella</i> : általános bevezetés	8
1.2. A baromfi mint az ember <i>Salmonella</i> fertőzésének fő forrása	9
1.3. <i>Salmonella</i> fertőzés kialakulása baromfiban	10
1.3.1. A baromfi szalmonellózis	10
1.3.2. A <i>Salmonella</i> fertőzés folyamata	11
1.3.3. Az invázió molekuláris mechanizmusa	14
1.4. A <i>Salmonella</i> elleni vakcinázás, mint a megelőzés egyik specifikus lehetősége a baromfitartásban	17
1.5. Célok	20
2. A flagellin rendszer és PCR-es feltérképezése különböző Salmonellákban	
2.1. Bevezetés	21
2.2. Anyagok és módszerek	23
2.2.1. Baktériumtörzsek	23
2.2.2. Polimeráz láncreakció (PCR)	23
2.3. Eredmények és megbeszélés	27
3. Flagellin bénítás <i>Salmonella</i> Enteritidisben irányított transzpozon mutagenézis segítségével	
3.1. Bevezetés	32
3.1.1. Flagellinek, mint markerek	32
3.1.2. Transzpozonokon alapuló mutagenézis rendszerek	33
3.1.3. A mutagenézis rendszer felépítése	33
3.2. Anyagok és módszerek	35
3.2.1. Baktériumtörzsek	35
3.2.2. Táptalajok, antibiotikumok	35
3.2.3. Plazmidok	35
3.2.4. Standard mikrobiológiai és molekuláris biológiai eljárások	35

3.2.5. Szekvencia analízis	38
3.2.6. Transzpozon mutagenézis baktérium konjugációval	38
3.2.7. Motilitás teszt	39
3.3. Eredmények	40
3.3.1. Előzetes kísérleti eredmények	40
3.3.2. A mutagenézis rendszer kidolgozása	40
3.3.3. Irányított mutagenézis kísérletek	42
3.3.4. Az izolált mutánsok analízise	45
3.3.5. Az FljA-IS30 fúziós transzpozáz fenotípusos hatása	49
3.4. Megbeszélés	51
4. Virulencia plazmid üzés a <i>Salmonella</i> Enteritidis 11 törzsből	
4.1. Bevezetés	56
4.1.1. A <i>Salmonella</i> virulencia plazmid szerepe	56
4.1.2. Plazmidüzési lehetőségek	57
4.2. Anyagok és módszerek	59
4.2.1. Baktériumtörzsek	59
4.2.2. Táptalajok, antibiotikumok	59
4.2.3. Plazmidok	59
4.2.4. Standard mikrobiológiai és molekuláris biológiai eljárások	59
4.2.5. Plazmid üzési kísérletek hagyományos (fizikai-kémiai) módszerekkel	60
4.2.6. Transzpozon alapú plazmid üzés	61
4.3. Eredmények	63
4.3.1. Előzetes eredmények	63
4.3.2. Virulencia plazmid üzési eredmények hagyományos módszerekkel	63
4.3.3. A <i>Salmonella</i> virulencia plazmid transzpozon alapú eliminálása	64
4.4. Megbeszélés	72
5. A vakcinajelölt törzsek ártalmatlansága és korai védekező képességet stimuláló hatása	
5.1. Bevezetés	76

5.2. Anyagok és módszerek	77
5.2.1. Baktériumtörzsek	77
5.2.2. Táptalajok, antibiotikumok	77
5.2.3. <i>in vitro</i> sejt inváziós kísérletek	78
5.2.4. <i>in vitro</i> IL-8 indukciós kísérletek	79
5.2.5. Kísérleti állatok és állatkísérleti modell	81
5.3. Eredmények	85
5.3.1. Az <i>in vitro</i> sejtinváziós és IL-8 indukciós vizsgálatok eredményei	85
5.3.2. A naposcsibe szerv inváziós és vakbél kolonizációs kísérletek eredményei	88
5.3.3. Korai védőhatás és ártalmatlanság	93
5.4. Megbeszélés	101
Záró megbeszélés	105
Konklúziók	110
Irodalomjegyzék	112
Tudományos publikációk	126
Köszönetnyilvánítás	129

Rövidítések jegyzéke

Ap: ampicillin

BTK: bróm-timol kékes agar

CEF: csirke embrió fibroblaszt (chicken embryo fibroblast)

CIG: az IS30 konszenzus szekvenciája (consensus of insertions in genome of *E. coli*)

Cm: kloramfenikol

DAS ELISA: Double antibody sandwich Enzyme –linked immunosorbent assay

DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium

IPTG: izopropiltio- β -D-galaktozid

IS: inszerciós szekvencia

Km: kanamycin

LB: Luria-Bertani tápleves

MEM: minimal essential medium

MQ: MilliQ szűrt víz

Nal: nalidixinsav

O/N: éjszakán át tartó inkubáció (over night)

PAGE: poliakril-amid

PBS: foszfát puffer

PCR: polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction)

RV: Rappaport-Vassiliadis dúsító

SCV: *Salmonellát* hordozó vakuólum (*Salmonella* containing vacuole)

SDS: nátrium dodecil szulfát

SOC: (super optimal catabolite repression broth)

SPF: meghatározott patogénektől mentes állat (specified pathogen free)

SPI: *Salmonella* patogenitási sziget (*Salmonella* pathogenicity island)

TAE: tris acetát EDTA puffer

TBE: tris borát EDTA puffer

TE: tris EDTA oldat

Tn: transzpozon

TSB: tripton szója leves

TTSS: hármastípusú szekréciós rendszer (Type three secretion system)

Összefoglalás

Munkánk elsődleges célja olyan transzpozon mutagenézis rendszerek kidolgozása és kipróbálása volt, 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.

Munkánk első lépésében egy 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. A módszer segítségével több flagellin bénított mutánst állítottunk elő.

A hagyományos módszerekkel nehezen kiűzhető, nagyméretű *Salmonella* virulencia plazmid kiűzésére új, transzpozon alapú eljárást dolgoztunk ki. A módszer a flagellin mentes *S. Enteritidis*-ben 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 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.

1. Irodalmi áttekintés

1.1. *Salmonella*: általános bevezetés

A *Salmonella* leírása a 19. század végére tehető, az első *Salmonella choleraesuis* törzset D. E. Salmon amerikai bakteriológus 1886-ban – mint azóta tudjuk, sertéspestisben megbetegedett - sertésből izolálta az USA-ban. A *Salmonella* genus az *Enterobacteriaceae* családba tartozik, az ide sorolt túlnyomó többségükben fakultatív kórokozó baktériumok egyenes, 2-5 µm hosszú pálcák, néhány kivételtől eltekintve motilisak, bontják a glükózt és a nitrátot képesek nitritté redukálni.

A *Salmonella* nevezéktan és taxonómia meglehetősen komplex, és a szakirodalomban esetenként a mai napig nem egységes és általános érvényű. A szakirodalom sokáig a White – Kauffmann féle felosztást használta (Czirók, 1999), amely szerológiai alapon készült, és a szomatikus (O) és a flagelláris (H) antigének azonosításán alapul. Ez a rendszer a *Salmonella* genust négy szubgenuszra osztotta, a szubgenuszon belül pedig a szerotípusokat faji rangra emelte. A taxonómiai módszerek fejlődésével az „egy szerotípus - egy faj” koncepció tarthatatlanná vált, és DNS – DNS hibridizációs módszerekkel a genust két fajra (*S. enterica* és *S. bongori*) osztották, melyek közül a *S. enterica* további hat alfajra osztható fel (Crosa és mtsai., 1973, LeMinor és mtsai., 1982). Az alfajok tovább oszthatók szerovariánsokra, így amit a köznapi nyelvben a fajnév második tagjaként használunk az tulajdonképpen a szerovariáns neve: ennek megfelelően a *Salmonella* Enteritidis pontos meghatározása *Salmonella enterica* subsp. *enterica* szerovar Enteritidis.

A gyakorlatban azonban praktikus okokból rögzült a korábbi felosztás, így a mai bakteriológiai nomenklatúrában a *Salmonella* kivételezett helyzetben van. Míg más csoportokban a név nem utal a szerológiai tulajdonságokra, addig a szalmonelláknál a szerovariánsoknak önkényesen adott nevek máig alkalmazhatók. A legfrissebb ajánlások szerint (Brenner és mtsai., 2000, Epiinfo, 2000) a szerovariáns név - jelezve, hogy nem önálló fajokról van szó - nagy kezdőbetűvel és nem dőlt betűvel írandó, pl. *S. Enteritidis*.

Az állatorvosi gyakorlatban előforduló, melegvérű állatokat megbetegítő szalmonellák többnyire a *S. enterica enterica* szubspecieszbe tartoznak, a többi öt alfaj és a *S. bongori* főként hidegvérű állatokban és környezeti mintákban fordul elő (Brenner és mtsai., 2000, Uzzau és mtsai., 2000). A melegvérű állatokban előforduló szerovariánsokat pathogenitásuk szempontjából leggyakrabban a gazda fajokhoz való viszonyuk szerint csoportosítják.

Azokat a szalmonellákat, amelyek kizárólag egy adott fajt képesek megbetegíteni gazdaspecifikus (host restricted) szerovariánsoknak nevezzük (Uzzau és mtsai., 2000). Példák erre a csoportra a *S. Gallinarum*, amely csak baromfit, a *S. Abortusovis*, amely csak juhot, a *S. Typhisuis*, amely csak sertést és a *S. Typhi*, amely csak az embert és a csimpánzt képes megbetegíteni. A gazdaspecifikus szerovariánsok eltérő tünetekkel járó szisztémás fertőzést okoznak a gazda fajban, de általában nem enteritist. Egy adott gazdához alkalmazkodott (host adapted) szalmonelláknak nevezzük azokat a szerovariánsokat, melyek gyakran fordulnak elő egy adott gazdafajban, azonban más fajokat is képesek megbetegíteni. A két legismertebb gazdához adaptálódott (host adapted) szerovariáns a *S. Dublin*, amely szarvasmarhához és a *S. Choleraesuis*, amely sertéshez alkalmazkodott. Ritkán, de ezen szerovariánsok képesek megfertőzni az embert, és ilyen esetben igen virulensek (Threlfall és mtsai., 1992). Ezért az adaptációs folyamat felfogható úgy, mint az adott gazda populációban való cirkuláció és fennmaradás képessége (esetenként tünetmentes hordozással), mely a szerovariánsnak a többi gazdafajra vonatkozó virulenciától független (Kingsley és Baumler, 2000). Végül egy külön gyűjtőnév alatt megemlítem azt a több száz szerovariánst, mely képes gasztroenteritist okozni a gazdafajok széles skáláján. Ezek a széles gazdaspektrumú szalmonellák. Ezek között kiemelkedő fontosságú a *S. Enteritidis* és a *S. Typhimurium*, a két, baromfiból gyakran izolált szerovariáns, melyekre közegészségügyi jelentőségük miatt is különös figyelmet kell fordítanunk (EU Zoonózis Rendelet 2003, 2006).

1.2 A baromfi mint az ember *Salmonella* fertőzésének fő forrása

A hazai humán szalmonellózisokról az ún. "bakteriális enterális surveillance" keretében az utóbbi években szélesebb körben is hozzáférhető, pontos adatok jelennek meg, melyek szerint a 80-es évek második felétől a szalmonellózis esetek száma folyamatosan emelkedett, s így 1996-ban már 31 270, bakteriológiailag is igazolt esetet regisztráltak. Ezt követően az első kedvező jelnek vélhető csökkenést 1997-ben észlelték, mely 2005. év végéig töretlenül folytatódott (Epinfo 2004, 2006), de hazánkat így is az EU átlaghoz képest magasabb arányú szalmonellózis gyakoriság jellemzi. Az izolált törzsek között a *S. Enteritidis* dominanciája folyamatosan erősödött (1992. évi 69%-ról 1996. évi 88%-ra), míg a *S. Typhimurium* (3-5 %) és *S. Hadar* (1-2%) alacsony szinten maradt, a *S. Infantis* viszont az utóbbi években (2004-2006 között, 5-7%-os részaránnyal) a 2-3. helyre került. A már említett "bakteriális enterális surveillance" 1994-97. évi adatai szerint a szalmonellózis (79-88%-ban *S. Enteritidis* okozta) járványok 76-99%-a élelmiszer által közvetített járvány volt, melyen belül a baromfi eredetű

élelmiszerek erősen (66-96%) domináltak (Epinfo 2004, 2006). Ezen adatok összhangban vannak a baromfihús és tojás eredetű *Salmonella* tipizálás legutóbbi eredményeivel, de messze nem olyan mértékben és nem olyan szoros időbeni egybeesést mutatva, mint azt várnánk (*S. Enteritidis* dominanciája baromfihús esetén később következett be és nem olyan szembetűnő). Korábban a baromfihúsban a *S. Enteritidis* nem volt gyakori, bár a *S. Enteritidis* fágtypizálások eredményei a baromfi termékek (elsősorban tojás) és a humán szalmonellózisok bizonyos kapcsolatát megerősíteni látszottak (Nagy és mtsai., 1993), melynek lényegén az időközben bekövetkező *S. Enteritidis* fágtypus eltolódás (1-es fág csoport rovására a 6-os előretörése) sem változtatott (László és mtsai., 1993). Az 1999-2002-es években szalmonellózisok fent említett csökkenése folytatódott: a 2000-2005. évi izolálások összességében az 1996. évi csúcshoz mintegy felét-harmadát tették ki. Az okok – a szalmonellózist mint komplex zoonózist ismerve – valószínűleg nem csupán egyetlen tényezőben keresendők. A *S. Enteritidis* - szinte világméretű - elterjedésének és tartós dominanciájának okát illetően született számos elmélet közül sem tudjuk pontosan melyik és mennyiben lehet az igazi. Az minden esetre nagyon valószínű, hogy az intenzíven tartott baromfi állományokban olyan klónok passzálódtak fel, melyek emberre nézve a korábbinál erősebb pathogenitással rendelkeznek. Erre utalnak a fent említett – főként baromfi tojás eredetű – *S. Enteritidis* okozta étel fertőzésekre vonatkozó adatok, s a fenti, korábbi 66-99%-os élelmiszer eredet, mely azonban 2001-re kb 55%-ra csökkent. Ami a *S. Enteritidis* fágtypusokon belüli fent említett magyarországi változásokat illeti, arra egyik magyarázatunk a Magyarországon megfigyelt, ún. kis plazmidokkal való átfertőződés is lehet (Gadó és mtsai., 1998).

1.3. *Salmonella* fertőzés kialakulása baromfiban

1.3.1. A baromfi szalmonellózis

A *Salmonella* pathogenitása baromfiban is elsősorban az állat korától, immunológiai állapotától és a fertőző baktérium szerovariánsától, virulenciájától függ.

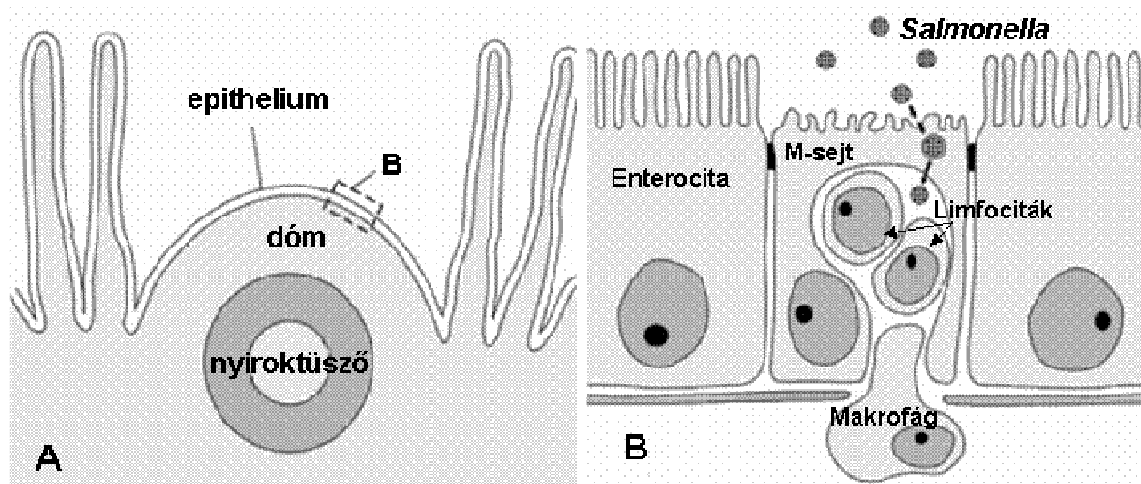
Külön kategóriát alkot a baromfi specifikus *S. Gallinarum* és annak biokémiai variánsa a *S. Pullorum*, amelyek a baromfitífusz okozói. Ezek a törzsek rendszerint magas mortalitással járó, súlyos fertőzést okoznak, azonban jelentőségük mára, a sikeres eradikációs programoknak köszönhetően, nagymértékben csökkent. (Varga és mtsai., 1999)

A *S. Gallinarum*-*Pullorum*tól eltérő egyéb szerovariánsok esetében viszonylag kevés adat áll rendelkezésre baromfiban a fertőző és megbetegítő képesség tekintetében. Elsősorban a *S. Typhimurium*ról és a *S. Enteritidis*ről ismert, hogy képesek súlyos tünetekkel járó szalmonellózist okozni fiatal madarakban (Halavatkar és Barrow 1993, Desmidt 1997). A mortalitási ráta egyes törzsek esetében elérheti akár a 80%-ot is. Az első 72 óra elteltével azonban a naposcsibék természetes rezisztenciája gyorsan kialakul a *Salmonella* fertőzések ellen, köszönhetően az immunsejtek – elsősorban a makrofágok – érésének és a kompetitív bélflóra kialakulásának – az úgynevezett kompetitív kizárás, „competitive exclusion” jelenségének (Barrow, 2000). Egyes *S. Enteritidis* törzsek azonban ennek ellenére képesek tünetmentes és krónikus fertőzéseket kialakítani elsősorban a tojó és tenyész állományokban (Hinton 1989, Hopper 1988, Lister 1988), mely utóbbiakból a petefészekben való megtelepedési hajlamuknak köszönhetően a fertőzést vertikális (germinális) úton az utódokra is átvihetik.

1.3.2. A *Salmonella* fertőzés folyamata

A fent említett, viszonylag ritka vertikális fertőzéstől eltekintve, az ún. nem typhoid szalmonellákat illetően a baromfi esetében is elsősorban az orális fertőzési út jellemző. Ilyenkor a többnyire fekális eredetű *Salmonella* elsődleges forrása az alom, a táplálék vagy az állat környezete. A horizontális fertőzésnél ritkábban előforduló vertikális (germinális) fertőződés esetén a *Salmonella* az ováriumon és a petevezetéken keresztül a tojásba s így az embrióba jut (Poppe, 2000). Fiatal állatokban a fertőzést általában súlyos szervi invázió követi, amely az egyidejűleg kialakuló hasmenés miatti dehidráció valamint anorexia tünetei mellett esetenként elhulláshoz, máskor növekedésbeni elmaradáshoz vezet (Wallis 2006, Varga és mtsai., 1999).

Az orális *Salmonella* fertőzést követően a begy savas közegét túlélő, bélrendszerbe jutó baktériumok szaporodni kezdenek a középbél csatornájában, majd a felszíni bélsejtekhez való tapadást követően megpróbálnak betörni a bélfal mucosa rétegébe (Barrow 1987). Ennek során a baktériumok elsősorban a nyiroktüszőkön keresztül jutnak a szervezetbe, amelyek a középbéli szakaszon jellegzetes anatómiai formába, az ún. Peyer-féle plakkokba tömörülnek. Így a Peyer plakkok, és a felületükön nagy számban előforduló M (microfold)-sejtek jelentik a *Salmonella* számára az elsődleges belépési kaput a szisztémás fertőzés felé (1. ábra) (Baumler és mtsai., 2000, Jepson és Clark, 2001).

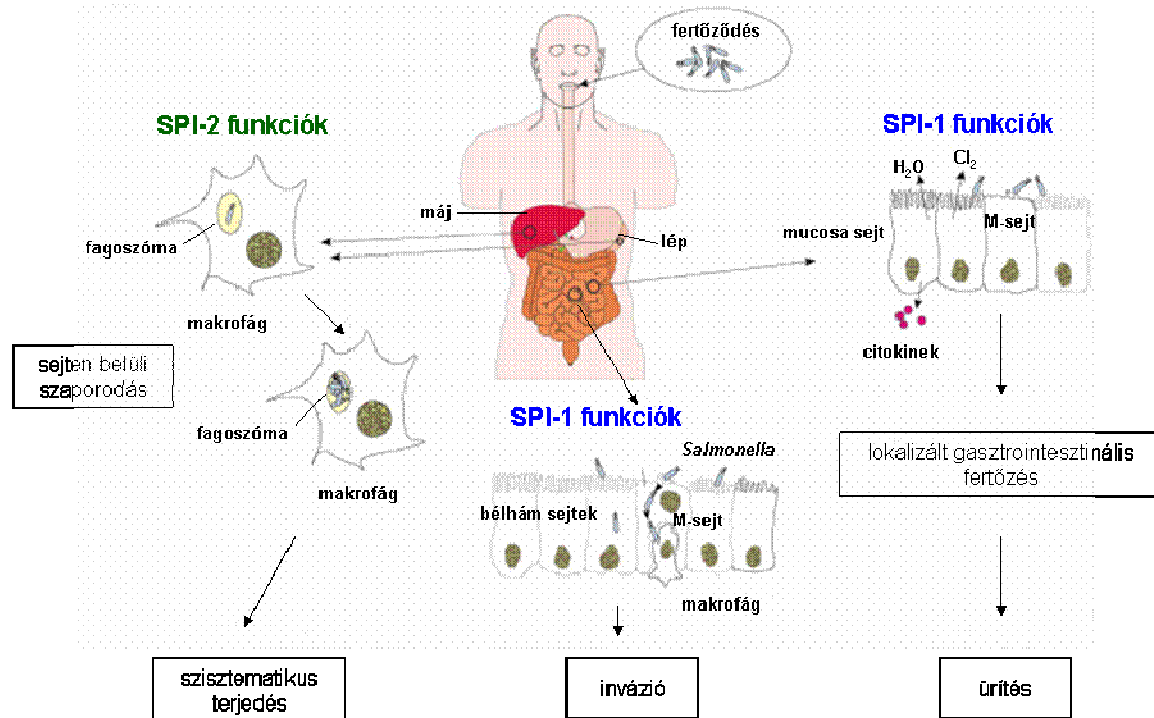


1. ábra A mucosa asszociált limfoid szövet vázlatos szövettani szerkezete. Az ábra A részén egy Peyer-féle plakk keresztmetszete látható a hozzá kapcsolódó nyiroktüszővel és a jellemző, villusoktól mentes ún. dóm struktúrával. Az ábra B részén a Peyer-plakkot fedő hám jellegzetes sejttípusa, az M (mikrofold)-sejt vázlata látható (Jepson és Clark (2001) ábrája alapján).

Az orális fertőzést követő invázió folyamata két jellegzetes fázisra: az intesztinális és a szisztémás szakaszra osztható, amelyek időben és térben egyaránt jól elkülöníthetők. A *Salmonella* számára ezek a fázisok eltérő környezetet és stressz tényezőket jelentenek, ugyanakkor lehetővé teszik a különböző szakaszokra jellemző virulencia gének időben eltérő aktiválódását. Az invázió intesztinális fázisában a külső környezetből érkező baktériumot magas ozmotikus viszonyok, alacsony oxigén szint, bő tápanyag ellátottság és magas hőmérséklet fogadják. Feltehetően ezek a legfontosabb paraméterek, melyek elindítják az invázió során szükséges virulencia gének aktiválódását, mely virulencia gének többnyire egy-egy funkcionális és fizikai kapcsolatban álló géncsoportot (ún. pathogenitási sziget) alkotva fordulnak elő (1.: alább). A bélhámsejtekbe való bejutáshoz vezető folyamatban a *Salmonella* pathogenitási sziget 1 (*Salmonella* pathogenicity island-1, SPI-1) és a hozzá kapcsolódó virulencia gének játsszák a legfontosabb szerepet. Ezek összehangolt működésének köszönhetően a baktérium előbb a bélhámsejtekbe, majd a granulociták és makrofágok vakuólumaiba kerül (2. ábra).

A fertőzés szisztémás fázisában a baktérium a makrofágok vakuólumaiban él és szaporodik, majd ezek közvetítésével jut el a szervezet nyirokszerveibe. A vakuólumok belsejében alacsony Ca^{2+} és Mg^{2+} koncentráció, savas közeg és tápanyaghiány jellemző (Hensel 2000, Garcia-del Portillo, 2001). Ezek a körülmények a virulencia gének egy újabb csoportjának, a

Salmonella pathogenitási sziget 2 (*Salmonella* pathogenicity island-2, SPI-2) géneknek az aktiválódását váltják ki, melyek a makrofág természetes folyamatait befolyásolva segítik a *Salmonella* szervezetben való elterjedését (2. ábra).



2. ábra A *Salmonella* fertőzés során lezajló gazda-pathogén interakció fontosabb fázisai.

Az SPI-1 funkciók szükségesek a fertőzés kezdeti, intesztinális stádiumában, így szerepet játszanak a fagocitózisra képtelen sejtekbe való *Salmonella* invázióban és az epithélium áttörésében. Lokalizált gastrointesztinális fertőzés esetén szerepük van a hasmenéses tünetek kiváltásában is. Az SPI-2 kódolta tulajdonságok a fertőzési folyamat későbbi szakaszában, a szisztémás fertőzés kialakításában és a belső szervek kolonizációjában jutnak szerephez, melynek során a fagocita sejtekben való túlélés és szaporodás során szükségesek (Hansen-Wester és Hensel (2001) ábrája alapján módosítva).

Az orális *Salmonella* fertőzéstől az invázió teljes lefolyásáig különböző becslések szerint 180-270 gén összehangolt működésére van szükség (Baumler és mtsai., 2000). Ezek között a legfontosabb szerepet minden bizonnyal a pathogenitási szigetekhez és a virulencia plazmidhoz kötődő „klasszikus” virulencia gének játsszák, de a folyamathoz számos adhezin, stressz fehérje, chaperon és regulátor működése is szükséges.

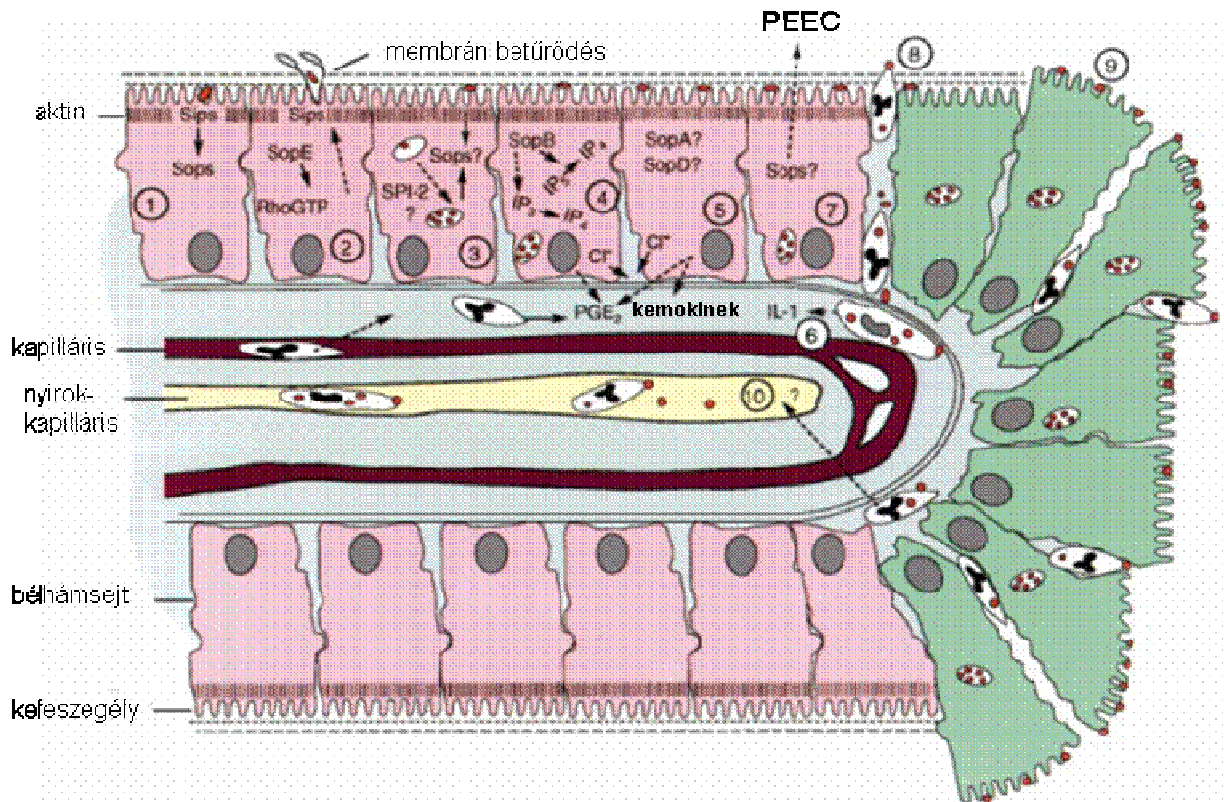
1.3.3. Az invázió molekuláris mechanizmusa

A *Salmonella* fertőzés molekuláris mechanizmusait elsősorban *in vitro* körülmények között emlős sejtvonalak segítségével, valamint *in vivo* egér modellen tárták fel. A baromfira vonatkozó specifikus molekuláris pathogenezist leíró adatok kevés számban állnak rendelkezésre. Az eddigi eredmények azt látszanak alátámasztani, hogy az emlősökön szerzett ismeretek jól alkalmazhatók baromfi esetén is.

Eddigi ismereteink szerint a folyamatot a következő főbb lépések jellemzik. A pathogenezis első bonyolult lépése az epitheliális sejtekbe való bejutás folyamata. Ennek során a *Salmonella* úgynevezett effektor fehérjék egész csoportját juttatja az eukarióta sejtbe, melyek összehangolt működésük segítségével megváltoztatják, modulálják annak természetes viselkedését, és olyan folyamatokat indukálnak, amelyek elősegítik a baktérium invázióját. A bélhámsejtekhez való tapadás után a *Salmonella* a pathogenitási sziget-1-en (SPI-1) kódolt hármastípusú szekréciós rendszere (type three secretion system, TTSS-1) segítségével az effektor fehérjéket a sejtbe injektálja (Zhou és Galán, 2001). A hármastípusú szekréciós rendszer a patogén baktériumokra jellemző szupramolekuláris képződmény, amelynek elsődleges feladata, hogy bakteriális fehérjéket juttasson az eukarióta sejtekbe. Szerkezetileg és evolúciósan is rokon a flagelláris export apparátussal, annak bazális testjéhez hasonlóan egy-egy membrán-lokalizált molekuláris gyűrűvel töri át a külső és belső bakteriális membránt, majd folytatódik egy kifelé mutató, tűszerű struktúrában, amely aztán az effektor fehérjéket molekuláris fecskendőként juttatja a célsejtbe. A *Salmonella* pathogenitási sziget-1 (SPI-1) egy nagy, 40 kb méretű genetikai elem, mely a bakteriális kromoszóma 63-as centriszómájánál helyezkedik el, és a TTSS-1 mellett számos invázióhoz szükséges effektor fehérjét is kódol (Lostroh és Lee, 2001). Ezek az SPI-1 effektorok az intesztinális epitheliális sejtek fehérjéivel kölcsönhatásba lépve olyan sejt szintű változásokat idéznek elő, melyek a *Salmonella* internalizációját eredményezik.

Első lépésként a SPI-1 hármastípusú szekréciós rendszerén keresztül a SopE, SopE2 és SopB effektor fehérjék jutnak a gazdasejtbe, amelyek egyes a Rho családba tartozó GTP-ázokat aktiválnak, kiváltva ezzel az aktin polimerizációját és a sejtvázatrendeződését (Chen és mtsai., 1996, Hobbie és mtsai., 1997). Tovább segítik az inváziós folyamatot az SPI-1-hez tartozó Sip család fehérjéi. A SipA effektor a kialakult aktin filamentumokhoz képes kötődni, és meggátolja az F-aktin átalakulását G-aktinná, valamint növeli a sejtben lévő T-plastin aktin kötő képességét (Zhou és mtsai., 1999, Hayward és Koronakis, 1999). A sejtvázatrendeződés és az új aktin filamentumok kialakulásának eredményeként a bélhámsejteken membrán

kitüremkedések jelennek meg és körbeveszik majd bekebelezzik a *Salmonellát*. A folyamat végeztével a hámsejt gyorsan visszanyeri eredeti alakját, köszönhetően az SptP bakteriális effektornak, amely a Sop család fehérjével ellentétben a kialakult aktin szálak depolimerizációját serkenti (3. ábra) (Takeuchi, 1967, Fu és Galán 1998, 1999).



3. ábra A *Salmonella* fertőzés folyamata és az általa kiváltott válaszreakciók a középbel mucosájában (Wallis és Galyov (2000) ábrája alapján módosítva).

1. A bélhámsejtekhez tapadt *Salmonella* aTTSS-1 segítségével a sejtbe juttatja a SPI-1 kódolta effektor fehérjéket (Sip és Sop fehérjék).
2. A sejtbe jutott effektor fehérjék membrán kitüremkedések (membrane ruffle) képződését idézik elő a hámsejteken, lehetővé téve a *Salmonella* inváziót.
3. Az intracelluláris baktériumok vezikulák belsejében szaporodnak, ennek során már a SPI-2 gének játsszák a főszerepet.
4. Egyes effektor fehérjék (pl. SopB) képesek befolyásolni a sejt szignál transzdukciós mechanizmusait, ezzel megváltoztatva az elektrolit háztartást folyadék kiáramlást okozni a sejtől.
5. A fertőzött epitheliális sejtek kemokinek és prosztaglandinokat termelve a fertőzés helyére vonzzák a lázkeltő sejteket.
6. A *Salmonella* kölcsönhatásba lépve az immunsejtekkel képes serkenteni azok citokin termelését és így erősíteni a lázkeltő reakciót.
7. A fertőzött sejtek kemoattraktáns molekulákat (PEEC: pathogen-elicited epithelial chemoattractant) bocsájtanak a lumenbe, amely serkenti a polimorfonukleáris (PMN) sejtek kivándorlását.
8. A bélbe beszűrődő immunsejtek a fertőzés helyére vándorolva bekebelezzik a baktériumokat.
9. A fertőzött bélhámsejtek leválnak a bélbolyh felszínéről, ezzel a bélbolyhok rövidülését és a felszívó felület csökkenését okozva.
10. Súlyos fertőzés esetén a fertőzött immunsejtek a nyirokkeringésen keresztül a belső szervekbe juttathatják a *Salmonellát*.

Érdekes, hogy a *Salmonella* fertőzés indukálta lázkeltező reakciók szintén a korai fázisú effektor fehérjékhez köthetők, hiszen ugyanazon, általuk aktivált Rho GTP-ázok indítják el azt a szignál transzdukciós kaszkádot, amelyek az aktin átrendeződést is képesek kiváltani. Működésük eredményeként a fertőzött sejtben interleukin-8 és más kemoattraktánsok termelődnek, melyek hatására végül polimorfonukleáris limfociták (PMN) és egyéb korai immunsejtek a fertőzés helyén jelennek meg (Chen és mtsai., 1996 Hobbie és mtsai., 1997).

A fertőzési folyamat előrehaladtával a *Salmonella* képes szisztémás, az egész szervezetre kiterjedő fertőzést kialakítani. Ennek eredményeként a belső szervekben, elsősorban a lépben és a májban igen magas számban található meg a baktériumok (Barrow és mtsai., 1999). A fertőzés szisztémás fázisa a bélfalba vándorló makrofágok és más fagocita immunsejtek közvetítésével zajlik, amelyek vakuolumaiban a szalmonellák képesek túlélni, szaporodni és a szervezet távoli részeibe eljutni. A fertőzés kései, szisztémás szakaszában a *Salmonella* pathogenitási sziget-2 (SPI-2) veszi át a szabályozó szerepet az SPI-1-től, saját hármastípusú szekréciós rendszere (TTSS-2) és effektor fehérjéi segítségével (Hensel és mtsai., 2000).

A szalmonellák számos eszközzel rendelkeznek, mely lehetővé teszi számukra a makrofágokban való túlélést. Az internalizáció után a baktérium a makrofág egy speciális organellumában, az ún. *Salmonella* hordozó vakuólumban („*Salmonella* containing vacuole”, SCV) helyezkedik el, mely a molekuláris markerei alapján a korai stádiumú endoszómákkal mutat hasonlóságot. A vakuólum belsejében lévő szalmonellák képesek megakadályozni, hogy a SCV fúzionáljon a lizoszómákkal, ezáltal kialakuljon benne a baktériumokra toxikus környezet (Buchmeier és Heffron 1991).

A makrofágok baktériumok elleni leghatékonyabb fegyvere a reaktív nitrogén és oxigén gyökök termelése, amelyet a *Salmonella* eredményesen képes gátolni a SPI-2 kódolta effektorok segítségével. A makrofág NADPH fagocita oxidáza az egyik legfontosabb enzim komplex ezen a téren, amely oxigénből szuperoxidot állít elő, prekuzort szolgáltatva a további reaktív oxigén gyökök szintéziséhez. Nyugalmi állapotban az enzim komplex egyes összetevői a citoszólban, mások a sejtmembránhoz kötődve helyezkednek el, így gátolva a szabadgyökök szükségtelen képződését. Pathogén stimulus hatására a rendszer összetevői aktív enzimkomplexszé állnak össze a fagoszómális membránban, amely megkezd a szabadgyökök termelését (Vazquez-Torres és Fang, 2001). A *Salmonella* azonban képes megakadályozni a keletkező, NADPH oxidázzal telt vezikulák fúzióját az SCV-vel, ezúton védekezve a termelődő reaktív oxigén származékok ellen. Bár a folyamat részleteiben még nem tisztázott, az SPI-2 termelte SpiC effektor fehérje biztosan szerepet játszik benne,

feltehetően a vezikulumokat mozgató aktin háló blokkolásán keresztül (Vazquez-Torres és Fang, 2001).

A fagocita immunsejtek endoszómális rendszerének blokkolásán túl az invázív szalmonellák feltehetően makrofágok életképességét is a saját javukra képesek befolyásolni. A fertőzés kezdeti szakaszában, mikor az immunsejtek kezdenek megjelenni a bélfalban, a baktériumok főként nekrosis jellegű, caspase-1 függő sejthalált indukálnak a makrofágokban, amely további immunsejteket vonz a helyszínre. A folyamat a SPI-1 termelte SipB effektor proteinhez köthető, amely a fertőzés kezdeti fázisában termelődik (Knodler és Finlay, 2001). Feltehetően ebben a korai stádiumban a lázkeltő gyulladási reakciónak ez a fajta serkentése segít elterjedni a *Salmonellának* az intesztinális közegből az egész szervezetbe (Monack és mtsai., 2000).

A fertőzés szisztémás fázisában a gyors, nekrosis szerű sejthalál nem figyelhető meg. Ekkor a baktérium a vakuólumokban szaporodik, miközben a makrofág segítségével mind mélyebb rétegeit éri el a szervezetnek. Ilyenkor egy késleltetett jellegű apoptózis figyelhető meg a fertőzött makrofágok között, amely elegendő időt hagy a *Salmonellának* a terjedésre (Jesenberger és mtsai., 2000, van der Velden és mtsai., 2000).

1.4. A *Salmonella* elleni vakcinázás, mint a megelőzés egyik specifikus lehetősége a baromfitartásban

A hazai élelmiszerhigiéniai igényeket hosszabb távon és biztonságosan kielégítő termék előállítás megköveteli, hogy a *Salmonella* ellen egy országosan megszervezett és jól működtetett „*Salmonella* csökkentési program” keretében és segítségével is védekezzünk, melyben helyet kapnak specifikus és nem specifikus eszközök. Ennek alapvonalait korábbi hazai közlemények (Nagy és mtsai., 1997, 2001) ismertették, újabban pedig az EU zoonózis rendelete (2160/2003 EK) írja elő .

A vakcinázást csak az utóbbi években soroljuk az állatok szalmonellózisa elleni védekezés mindennapos gyakorlatban alkalmazható specifikus lehetőségei közé (Varga és mtsai., 1999). Ennek oka többek között a *Salmonella* virulencia faktorokról, azoknak a kórfejlődésben játszott szerepéről és a bél-immunitás kialakulásának részleteiről szerzett ismereteink bővülése, továbbá az az igény, mely elsősorban a tömeges baromfi hús és tojástermelés higiénés szempontból rendszerint kedvezőtlen körülményei között kívánja a *Salmonella* fertőzöttséget visszaszorítani.

A rendelkezésre álló irodalmi és gyakorlati tapasztalatok azt mutatják, hogy az egyes állatfajoknál - különösen baromfinál - a paratífuszt okozó *Salmonella* serovarok elleni vakcinás védekezés napjainkra „polgárjogot kapott”, s több elölt (parenterális) illetve élő (orális) vakcina van forgalomban, melyek a *S. Enteritidis* ill. *S. Typhimurium* elleni specifikus védelmet szolgáltatják. A baromfi és néhány más állatfaj esetében ugyanis az ún. paratífuszt okozó (említett) *Salmonella* serovarok általában különösebb bántalom nélkül tartanak fenn fertőzöttséget, mely igazi veszélyt az emberre nézve jelent. Ez a veszély azonban az iparszerűen tartott állatfajok esetében - különösen a tömeges tartás és vágóhídi feldolgozás miatt - oly mértékben megnövekedett, hogy a korábbi orvosi szemlélet által helytelennek ítélt immunizálási eljárásokat (inaktivált és/vagy élő-attenuált baktériumokkal) is fontolóra kellett venni. Az élő, orálisan alkalmazott vakcina törzsek kétségtelenül hatékonyabb helyi és általános immunitást nyújtanak, azonban az attenuáció (virulencia csökkenés) mértéke a hatékonysággal fordított arányban van s ezért igen nehéz olyan *Salmonella* törzset előállítani, melynek alkalmazása kellően hatékony, de ugyanakkor teljes mértékben aggálytalan legyen.

A fenti elvárásokat Linde (Lipcse) *S. Typhimurium* ún. purin auxotróf mutáns törzse segítette eloszlatni, melyet a volt NDK területén Meyer és mtsai igen alapos munkája nyomán "Zoosaloral" néven évtizedeken át használtak, anélkül, hogy egyetlen egyszer is humán megbetegedést okozott volna (Meyer és mtsai., 1993, Methner és mtsai., 1997). Mivel a törzs biokémiailag a vad törzsektől elkülöníthető, célzott vizsgálatokkal azt is megállapították, hogy tünetmentes *Salmonella* hordozást is csak igen ritkán és rövid ideig képes előidézni. Tekintettel a baromfitól eredő, *S. Enteritidis* (és részben *S. Typhimurium*) okozta egyre növekvő mérvű humán megbetegedésekre a Zoosaloral élő orális vakcina alkalmazását (Zoosaloral-H néven) szélesebb körben megkísérelték a baromfi állományok immunizálására is, melynek kezdeti látványos sikerei után a TAD cég is elkezdte hasonló *S. Typhimurium* elleni vakcináját (*Salmonella* Vac T) széles körben alkalmazni, ugyancsak jelentős sikerrel.

S. Typhimurium és *S. Enteritidis* élő orális vakcinázások hatékonyságának összehasonlítása céljából korábban témacsoportunk is végzett ún. kereszt immunizálási és ráfertőzési kísérleteket, melyek alapján egy kísérleti *S. Enteritidis* (*aroA*⁻) vakcinatörzs *S. Enteritidis* ellen a Zoosaloral-H vakcinához hasonló, kielégítő korai védettséget adott. A *S. Typhimurium* fertőzéssel szemben viszont a homológ, Zoosaloral-H vakcina volt jobb (Nagy B. 1999). A tapasztalatok azt mutatták, hogy a fenti keresztvédelemre elsősorban az immunizálás utáni első 2 hétben lehet számítani. A *S. Typhimurium* vakcinának a *S. Enteritidis* elleni csökkentebb védőértékét tapasztalva, egyre többen foglalkoznak *S. Enteritidis* élő orális vakcinák előállításával is (Immerseel és mtsai., 2005). Nincs azonban még elegendő

tapasztalatunk az egyes élő orális vakcinák alkalmazását követő baktérium ürítésről, valamint a típus, illetve szerovariáns váltás lehetőségeiről.

Bár a *S. Enteritidis* elleni élő orális vakcinák használata széles körben terjed, létjogosultsága van a *S. Enteritidis* (és *S. Typhimurium*) előlt virulens baktériumaiból készített (inaktivált), parenterális (s.c.) oltásra alkalmas vakcináknak, melyekkel a tojószezon előtt, - a hormonális átállással együtt járó - petefészekben való *Salmonella* megtelepedést s így a transzovariális fertőzésátvitelt lehet megakadályozni. Ilyen vakcinát több cég is megjelentetett a hazai piacon. Minden esetre, az erős fertőzési veszélynek kitett tenyész állományokban jelenleg még az egyik leginkább bevált módszer a csibék naposkori élő orális (*S. Typhimurium*), majd a tojószezon előtti inaktivált (*S. Enteritidis*) kombinált immunizálása.

Továbbra is gondot jelent viszont - elsősorban a parenterális *S. Enteritidis* vakcina alkalmazását követően - a baromfitífusz kórokozójával kapcsolatos antigén szerkezeti rokonság és a következményes szerológiai áthangolódás, mely miatt a baromfitífuszra irányuló eddigi szerodiagnosztikai módszerekről le kell mondanunk, s csupán a régóta jól bevált bakteriológiai ellenőrzési módszerekre (befulladt tojások, naposkori hullák vizsgálata) hagyatkozhatunk. Ezért a jövő e tekintetben nyilvánvalóan olyan ún. markerezett *S. Enteritidis* vakcináké, melyek a vad törzsek okozta áthangolódástól megkülönböztethető immunválaszt produkálnak.

A vakcinák továbbfejlesztése terén egyik legfontosabb feladatunk az élő orális vakcinák olyan irányú módosítása, hogy az általuk indukált védelem minél szélesebb körű (minél több szerovar ellen érvényesülő) legyen és lehetőség szerint a vakcina okozta immunitást (szerológiai választ) a természetes fertőzöttség által okozott áthangolódástól jól el tudjuk különíteni (markerezett vakcinák).

1.5. Célok

Fő cél: Olyan transzpozon mutagenézis rendszerek kidolgozása és kipróbálása, melyek segítségével *Salmonella* Enteritidis törzsek markerezése és virulencia csökkentése érhető el, távlati vakcina fejlesztések céljából.

5. A *Salmonella* Enteritidis és néhány egyéb érdekes szerovariáns törzseinek PCR-es vizsgálata flagellin termelés és flagellin fázisváltás szempontjából.
6. *Salmonella* flagellin génekre kidolgozott irányított transzpozon-mutagenézis rendszer létrehozása és működésének vizsgálata annak érdekében, hogy flagella mentes, ezáltal markerezett vakcinajelölt törzset állítsunk elő.
7. A markerezett törzs virulenciájának csökkentése a virulencia plazmid kiűzésének segítségével.
8. Annak vizsgálata, hogy az így előállított törzsek alkalmasak lehetnek-e egy esetleges élő, orális vakcina törzs előállítására.

2. A flagellin rendszer és PCR-es feltérképezése különböző *Salmonella* szerovariánsokban

2.1. Bevezetés

Az egyes *Salmonella* szerovariánsok meghatározása nagyban függ a specifikus savók termelésétől és használatától, melyek az egyes flagellin fázisok különböző komponenseit ismerik fel. A legtöbb *Salmonella* szerovariáns meghatározható a két flagellin struktúrgén (*fliC*, *fljB*) termékének szerológiai analízisével, melyek expresszálnak bifázisosan (felváltva fejeződik ki a kétféle flagellin), vagy monofázisos módon (csak egyféle flagellin fehérje termelődik) vagy lehetnek afázisos állapotban (nincs flagella, a baktérium nem mozgó fenotípussal rendelkezik).

A bifázisos *Salmonellák* speciális tulajdonsága a két flagellin gén (*fliC*, *fljB*) jelenléte, melyek a bakteriális kromozómán egymástól távol helyezkednek el. A két génről felváltva termelődő, különböző antigenitású flagellin fehérje segít elkerülni a kórokozó baktériumnak a gazda immunreakcióját (Macnab, 1996). A gének, amelyek a két különböző flagellin fehérjét (H1, H2) kódolják nagyon hasonlóak, de szekvenciájuk nem azonos (Okazaki és mtsai, 1993). A legnagyobb eltérések a flagelláris gének középső régiójában figyelhetők meg, mely a flagellin fehérje külső, antigenitásért felelős részét kódolja (Joys, 1985). A flagellin gének végei azonban igen konzervatívok, nem csak a szerovariánsokon belül, de az egész *Salmonella* genusban is. Ez annak köszönhető, hogy a bifázisos baktériumsejt mindkét terméke (H1, H2) úgy jelenik meg a sejtfelszínen, mint egy helikális bakteriális csilló, amely számos flagellin építőköből áll. Ezek a flagellin építőkövek a végeikkel kapcsolódnak össze, emiatt meg kell őrizniük szerkezetüket. Egy adott időben a két fázis közül az egyik mindig represszált állapotban van, így a sejt mindig homogén csillót termel.

A két flagellin gén közül a *fliC* kódolja a H1 fázisú flagellint, míg az *fljB* a H2 fázisú flagellin termeléséért felel. Azt, hogy a két struktúrgén közül mikor melyikről termelődik fehérje, az *flj* operon promóterének leolvasási iránya határozza meg. A promóter közvetlenül az *flj* operon előtt a *hixL* és *hixR* rekombinááz felismerő helyek között helyezkedik el. A *hin* helyspecifikus rekombinááz működése során hasítja a *hix* helyeken a DNS-t, és az általuk közrefogott szakasz – így az *flj* operon promóter – irányát megfordítja, ezzel indukálva a flagellin fázisváltást. Ha a promóter iránya az *flj* operon felé mutat, úgy lezajlik az *fljA* és *B* gének transzkripciója. Ekkor a baktérium a H2-es fázisba lép, vagyis az *fljB* génről termelődik a flagellin.

Egyidejűleg az *fljA* represszor fehérje kötődik a *fliC* operátorához, megakadályozva annak átíródását és a H1-es flagellin keletkezését. Ha a promóter iránya megfordul, az *fljB*-ről megszűnik a flagellin termelés és egyúttal az FljA represszor hiánya miatt a *fliC* felszabadul a gátlás alól és H1-es flagellint kezd termelni, így a sejt a H1-es fázisba lép (4A ábra, 32. oldal). A fázisváltás viszonylag ritka jelenség, 10^3 - 10^4 generációnként egyszer történik meg a promóter irányát megváltoztató inverzió. (Craig, 1988, Glasgow és mtsai, 1989)

A fent leírt, tipikus, bifázisos *Salmonellák* mellett azonban néhány jól ismert monofázisos és legalább egy nem mozgó szerovariáns is található, ahol a fázisváltás jelensége nem figyelhető meg. A fázisváltás hiányára több lehetséges magyarázat is található: ezek a szerovariánsok (i) rendelkeznek a teljes flagellin és fázisváltó rendszerrel, azonban a fázisváltás defektív, (ii) hiányoznak a flagellin génjeik, (iii) vagy azok nem expresszálódnak (Jones és Aizawa, 1991; Kilger és Grimont, 1993). A legkézenfekvőbb magyarázat – a fázisváltó rendszer (vagy egyes flagellin gének) hiánya, esetleg deléciója – egy megfelelő PCR-es szűrő rendszerrel is kimutatható lenne.

Munkánk első fázisaként egy olyan PCR rendszert dolgoztunk ki, mely a *Salmonella* flagellin struktúrgéneket és a fázisváltó rendszer egyes génjeit képes kimutatni. Ennek segítségével számos érdekes szerovariánst teszteltünk. A vizsgálatok távlati célja az volt, hogy egyes bifázisos és monofázisos *Salmonella* szerovariánsok flagellin gén rendszerének fontosabb elemeiről a jövőbeni irányított mutagenézis kísérleteket megelőzően tájékozódjunk.

2.2 Anyagok és módszerek

2.2.1. Baktériumtörzsek

A vizsgált baktériumtörzsek között egyaránt található emberi, baromfi vagy élelmiszer eredetű, amelyek hazai és külföldi mintákból származtak (I. táblázat). A törzsek szerológiai meghatározása az Országos Élelmiszervizsgáló Intézetben és az Országos Epidemiológiai Központban, Dr Kostyák Ágnes illetve Dr Herpay Mária vezetésével történt a standard eljárások szerint (Czirók, 1999, Edwards és Ewing, 1972). A *Salmonella* Typhimurium és *S. Enteritidis* törzsek esetében a szerológiai eredményeket szerovariáns-specifikus PCR reakciókkal is megerősítettük (Lin és Tsen 1999, Wood és mtsai, 1994).

2.2.2. Polimeráz láncreakció (PCR)

A különböző flagellin gének jelenlétét PCR reakciókkal vizsgáltuk, amelyhez saját tervezésű primereket használtunk. A primertervezés alapjául *Salmonella* Typhimurium (*hin*, *hixL*, *hixR*: EM_BA2:STHINZ), (*fljA*: EM_BA2:SFLJA2), (*fljB*: EM_BA2:ST17177) valamint *Salmonella* Enteritidis (*fliC* és annak operátor régiója: EM_BA2:SEFLICC) szekvenciák szolgáltak. A PCR primereket a tesztelendő gének, DNS-szakaszok konzervált szakaszaira terveztük, hogy a különböző szerovariánsok között esetlegesen meglévő polimorfizmusból adódó fals reakciókat elkerüljük. Az egyes primerek szekvenciáit és a termékek méreteit a II. táblázat tartalmazza. A reakciót 25 µl végtérfogatban futtattuk, ehhez ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) és T3 Thermocycler (Biometra) készülékeket használtunk.

A PCR reakció összetétele:

2,5 µl 10x PCR puffer

2 µl MgCl₂-oldat (25 mM)

1 µl dNTP (10 mM)

0,5-0,5 µl primer oldat (50µM)

0,25 µl Taq polimeráz enzim (5U/µl)

1 µl templát DNS

17,25 µl víz (MilliQ)

A PCR-hez szükséges reagensek a MBI Fermentas-tól, a primerek a gödöllői Mezőgazdasági Biotechnológiai Központ szolgáltató laboratóriumából (ma: Biomi Kft.) származtak. A templát DNS a baktériumok egyéjszakás levestenyészetéből kiindulva fagyasztásos-forralásos módszer szerint készült.

A reakció az alábbi program szerint zajlott: a kezdeti 94°C-os 3 perces denaturáció után 35-szörös ismétlésben a következő ciklus:

94°C-on 20 másodperc denaturáció,
55°C-on 30 másodperc primerkötődés,
72°C-on 90 másodperc szintézis.

A 35. ciklus után egy 72 °C-os, 5 perces végső extenziós lépés következett.

A PCR termékeket 1,5%-os TAE agaróz gélben futtattuk. A gélhez a kiöntés előtt a DNS láthatóvá tétele érdekében etídium-bromidot adtunk 0,5 µg/ml végkoncentrációban. Az elektroforézis horizontális gérendszerben, egyszeres töménységű TAE pufferben történt, 90-120 V feszültséggel. Az elektroforézist követően a géleket 302 nm hullámhosszú UV átvilágító asztalon digitális kamerával (Kodak Digital Science DC120) fényképeztük és a gélfotók archiválásához a Kodak Digital Science 1D programot alkalmaztuk.

I. Táblázat A vizsgált *Salmonella* törzsek és azok eredete

Szerovariáns	Törzs	Eredet	Minta
<i>S. Enteritidis</i>	SL/7293	Stocker (USA)*	baromfi
<i>S. Enteritidis</i>	3, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60	OÉVI	baromfi
<i>S. Enteritidis</i>	10091, 10092	MNT	emberi
<i>S. Enteritidis</i>	E 291, E 296, E 287/92, E 307/92, E 399/93	OEK	baromfi
<i>S. Enteritidis</i>	E 516, E 519, E 521, E 239, E 519/93, E 579/93, E 899/93, E 905/93, EI 3352	OEK	élelmiszer
<i>S. Enteritidis</i>	44/94, 208/94, 220/94, 225/94, 226/94, 117/94, 280/94, S 7, S 33, S 42, S 12	OEK	emberi
<i>S. Enteritidis</i>	79, 80	PTE	emberi
<i>S. Enteritidis</i>	85, 86	Humphrey (UK)	emberi
<i>S. Enteritidis</i>	87, 88	Humphrey (UK)	baromfi
<i>S. Enteritidis</i>	LA5, 105, 857	Naughton (UK)	baromfi
<i>S. Enteritidis</i>	90-13-206	Zijderveld (NL)	baromfi
<i>S. Typhimurium</i>	2, 8, 27, 2194, 2209	OÉVI	baromfi
<i>S. Typhimurium</i>	10040	MNT	egér
<i>S. Typhimurium</i>	10041, 15007	MNT	emberi
<i>S. Typhimurium</i>	421/101	Bábolna	baromfi
<i>S. Typhimurium</i>	98	Bábolna, vakcina törzs	baromfi
<i>S. Hadar</i>	18, 19, 20, 21, 22, 23, 24	Bábolna	baromfi
<i>S. Hadar</i>	40	OEK	emberi
<i>S. Hadar</i>	71, 72	OÉVI	baromfi
<i>S. Gallinarum</i>	220	ÁEGB	baromfi
<i>S. Gallinarum</i>	318	ÁEGD	baromfi
<i>S. Gallinarum</i>	319, 320, 321	OÉVI	baromfi
<i>S. Abortusequi</i>	10007, 10008	MNT	ismeretlen
<i>E. coli</i>	TG1 (negatív kontroll)	Gibson (UK)	K-12 labor törzs

Bábolna: Bábolna Rt., MNT: Orvosi Baktériumok Magyar Nemzeti Törzsgyűjteménye, OEK: Országos Epidemiológiai Központ, OÉVI: Országos Élelmiszervizsgáló Intézet, PTE: Pécsi Tudományegyetem, Orvosi Kar, Mikrobiológiai és Immunológiai Intézet, ÁEGB: Állategészségügyi Intézet, Békéscsaba, ÁEGD: Állategészségügyi Intézet, Debrecen, *: A származási országot minden külföldi törzsnél jeleztük.

II. Táblázat

A vizsgálatok során használt PCR primerek szekvenciái és a termékek mérete

Gén	PCR termék hossza (bp)	1. primer szekvenciája (5'-3')	2. primer szekvenciája (5'-3')
<i>hin</i>	590	hinNtermPstfor CCCTGCAGAT GGCTACTATT GGGTATATTC	hinCtermPstrev CCCTGCAGTT AATTCATTTCG TTTTTTTATA C
<i>fljA</i>	560	fljANtermPstfor CCCTGCAGAT GGAATGTATG GCTGTAAATG	fljACtermPstrev CCCTGCAGTT ATTCAGCGTA GTCCGAAGAC
<i>fljB</i>	1540	fljBatgfor CCGAATTCAT GGCACAAGTA ATCAACACTA A	fljBstoprev CGGGATCCTT AACGTAACAG AGACAGCACG
<i>hixL</i>	350	hixLfor CCGAATTCAT TTATTGGTTC TTGAAAACCA AG	hixLrev CGGGATCCGT AATTCTGATA TTAACGCCAC C
<i>hixR</i>	440	hixRfor CCGAATTCGT AATACAGGCG TATGGCATAA AT	hixRrev CGGGATCCGA CAGACGCTCG ATAGCGGTGC C
<i>fliC</i> operátor	370	sefliCfor GGGAATTCGC CATCTTCCTT TCGATTGCAA	sefliCoperatorrev CGGGATCCGG ACAGACGCTC AATAGCGGAA CTC
<i>fliC</i>	1540	sefliCforatg CCGAATTCAT GGCACAAGTC ATTAATACAA AC	sefliCrevstop CCGGATCCTT AACGCAGTAA AGAGAGGACG T

2.3. Eredmények és megbeszélés

A flagellin gének PCR-es vizsgálatát összesen 73 vad típusú *Salmonella* törzsön végeztük el, amelyek szerovaronkénti megoszlása a következőképpen alakult: *Salmonella* Typhimurium (n=10), *Salmonella* Hadar (n=10), *Salmonella* Enteritidis (n=46), *Salmonella* Gallinarum (n=5) és *Salmonella* Abortusequi (n=2). A vizsgálatok során a következő, flagellintermelésben és fázisváltásban szerepet játszó gének, DNS szakaszok jelenlétét vizsgáltuk: (i) a két flagellintermelő struktúrgént (*fliC*, *fljB*), (ii) a *fliC* flagellingén represszorát (*fljA*), (iii) a *fliC* gén operátor szekvenciáját valamint (iv) az invertáz rendszer tagjait (*hin*, *hixL*, *hixR*), amelyek a *Salmonella* flagellin-fázisváltásért felelősek. A vizsgálatok eredményeit a III. táblázatban összegezzük.

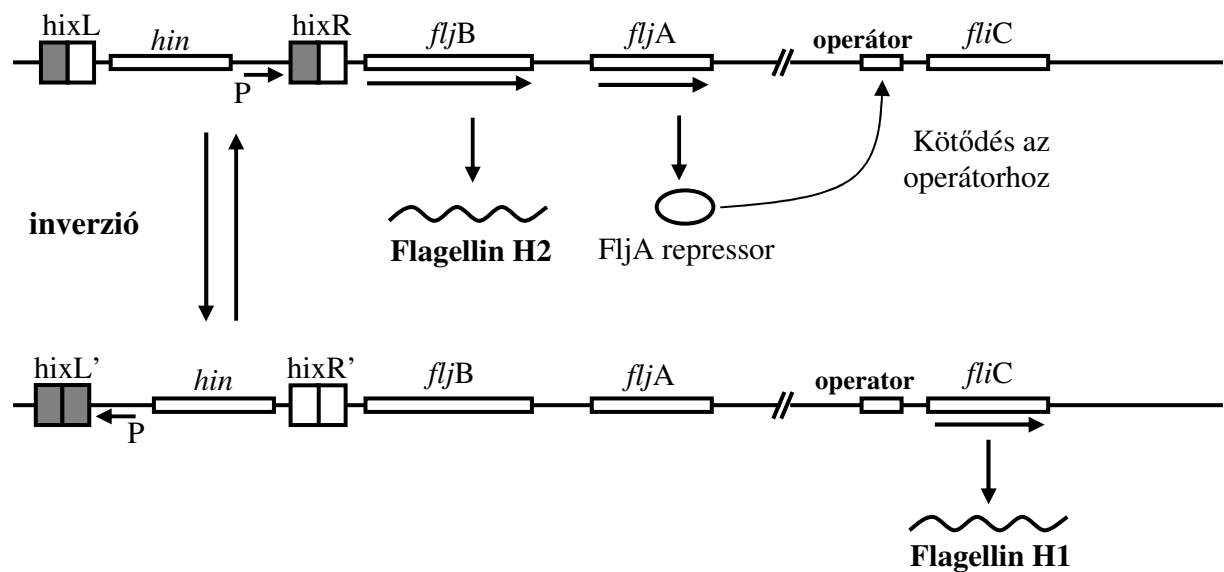
III. táblázat Egyes flagellin és fázisváltást szabályozó gének jelenléte különböző *Salmonella* szerovariánsokban PCR-es vizsgálatok alapján.

Vizsgált szerovarovok	Törzsek száma	<i>hin</i>	<i>hixL</i>	<i>hixR</i>	<i>fljA</i>	<i>fljB</i>	<i>fliC</i> operátor	<i>fliC</i>
<i>S. Typhimurium</i>	n=10	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. Hadar</i>	n=10	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. Abortusequi</i>	n=2	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. Enteritidis</i>	n=46	-	-	-	-	-	+	+
<i>S. Gallinarum</i>	n=5	-	-	-	-	-	+	+
<i>E. coli</i> TG1*		-	-	-	-	-	-	-

(* Negatív kontroll, Gibson, 1984)

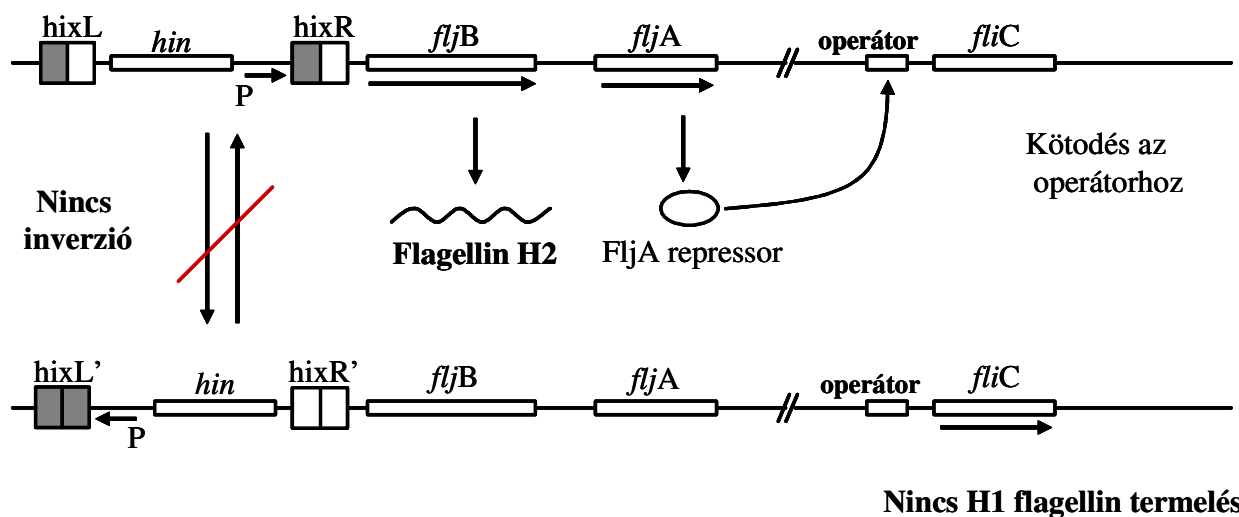
A vizsgálat eredményeként azt tapasztaltuk, hogy az azonos szerovariánshoz tartozó törzsek mindig azonos mintázatot adnak, de az egyes szerovariánsok között a flagellin gének jelenlétét illetően jelentős eltérések tapasztalhatók. A *S. Typhimurium*, és a *S. Hadar* törzsek esetében az összes vizsgált gén (*fliC*, *fljB*, *fljA*, *fljA* operátor, *hin*, *hixL*, *hixR*) megtalálható volt. Ezek az eredmények a *Salmonella* H antigénekre vonatkozó, a Kaufmann-White-féle szerotipizáló rendszer alapját is képező szerológiai ismereteket DNS szinten is megerősítik. Ennek megfelelően a B szerocsoportba tartozó *S. Typhimurium* és a C₂ szerocsoportba tartozó *S. Hadar* törzsek kétféle H antigénnel - és flagellin fázissal (H1 és H2) - rendelkeznek.

Összhangban a fentiekkel a PCR eredmények azt mutatják, hogy a fázisváltó rendszer elemei és mindkét flagellintermelő struktúrgén jelen vannak ezekben a szerovariánsokban (4A. ábra).



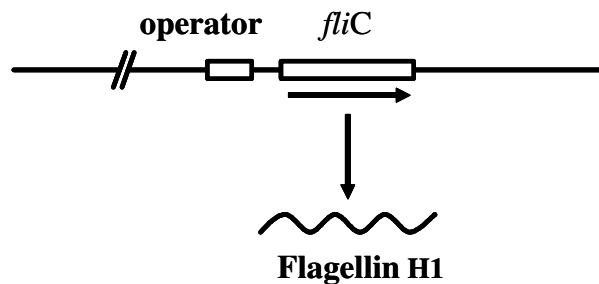
4A. ábra A *S. Typhimurium* és a *S. Hadar* fázisváltakozása (a *fliC* és az *fljB* flagellin gének váltakozó expressziója). Az *flj* operon promóterét nagy P-vel, az expresszió irányát a gének alatti nyíllal jelöltük.

Meglepő módon a *S. Abortusequi* törzsek esetében szintén kimutatható volt a teljes vizsgált flagellin és fázisváltó rendszer. A flagellin gének teljes jelenléte ellenére azonban a B szerocsoportba tartozó *S. Abortusequi* törzsek csak a H2 fázisban figyelhetők meg és nem képesek az antigénfázisuk megváltoztatására (4B. ábra, 5. ábra), melyre két kézenfekvő magyarázat lehetséges. Az egyik lehetőség, hogy a H1 fázisért felelős *fliC* gén mutációt szenvedett, amely nem teszi lehetővé FliC flagellin termelését, ezért a baktérium csak a H2 fázis megjelenítésére képes. A másik lehetséges ok, hogy a mutáció a *hin* helyspecifikus rekombinázból következett be, amely a fázisváltásért felelős. Sajnos a mi PCR-es módszerünkkel nem lehetséges eldönteni, hogy a két mutáció közül melyik áll fenn és okozza az *Abortusequi* törzsek monofázisos voltát, de irodalmi adatok szerint a baktérium H2 flagellin-fázisban való rögzülését a *hin* rekombinázból működésképtelensége eredményezte (Hanafusa és mtsai, 1993).



4B. ábra A *S. Abortusequi* fázisváltó rendszere. A mutáns *hin* rekombináz miatt nincs fázisváltás, a baktérium csak H2-es flagellint termel.

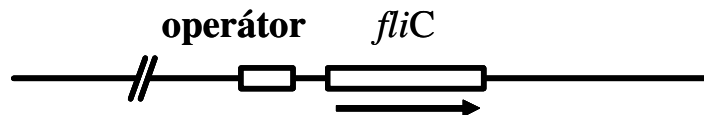
A *Salmonella* Enteritidis, hasonlóan a *S. Abortusequi*hez szintén csak egyféle fázisú flagellint termel. Érdekes módon azonban itt a helyzet a *S. Abortusequi*ben megfigyelhetőnek pont az ellentettje, hiszen a *S. Enteritidis* a H1 flagellint termeli (van Asten és mtsai, 1995). Ezt megerősítve, PCR eredményeink is azt mutatják, hogy a *S. Enteritidis* törzsekből mindig hiányzik a H2 fázisért felelős *fljB* gén, a represszor *fljA* gén, valamint a teljes fázisváltó rendszer (*hin*, *hixL*, *hixR*). Jelen van viszont a *fliC* és annak operátor szekvenciája, amelyek folyamatosan expresszálják a H1-es flagellint (4C. ábra, 5. ábra).



4C. ábra A *S. Enteritidis* törzsekben csak a *fliC* (és annak operátora) található meg, így ezen törzsek csak egyes fázisú (H1) flagellint termelnek.

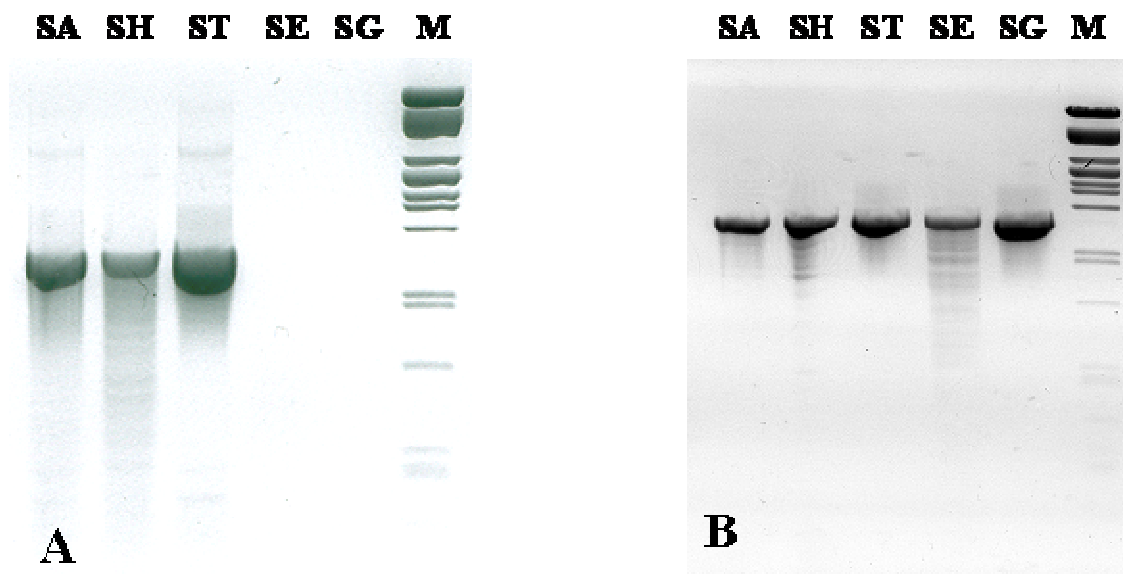
A *S. Gallinarum* és *S. Pullorum* törzseknek a teljes mozgásképtelenség és a flagellintermelés hiánya jól ismert tulajdonsága (ellentétben a *S. Enteritidis*szel, amelytől egyébként szerológiailag elkülöníthetetlenek lennének). Mindazonáltal, mozgásképtelenségük ellenére

PCR segítségével kimutatható ezen törzsekben a kriptikus *fliC* flagellin gén és annak operátor régiója (4D. ábra, 5. ábra). A jelenlévő *fliC* gén azonban minden valószínűség szerint olyan jelentős mutációt hordoz, amely lehetetlenné teszi flagellin termelődését erről a génről. (Zinder és Lederberg, 1952). Így, a flagellin gének jelenléte és mintázata is azt támasztja alá, hogy a *Salmonella* Enteritidis és *Salmonella* Gallinarum törzsek filogenetikailag közelebb állnak egymáshoz, mint más szerovariánsok törzseihez (Li és mtsai., 1993).



Nincs sem H1 sem H2 flagellin

4D. ábra A nemmozgó *S. Gallinarum* törzsekben jelen van a *fliC* és operátora, de arról nem termelődik flagellin.



5. ábra A flagellin gének PCR eredményei a különböző szerovariánsok esetén. A kettes fázisú (H2) flagellin termeléséért felelős *fljB* gén csak a *S. Abortusequi*, *S. Hadar* és *S. Typhimurium* törzsekben van jelen (A). A *fliC* flagelláris struktúgén az összes tesztelt szerovariánsban megtalálható (B). (Rövidítések: SA: *S. Abortusequi*, SH: *S. Hadar* ST: *S. Typhimurium*, SE: *S. Enteritidis*, SG: *S. Gallinarum*).

Amint a bevezetőben már említettük, az itt leírt PCR-rendszer a különböző bifázisos és monofázisos *Salmonella* szerovariánsok flagellin génjeinek és azok szabályozó régióinak tesztelése céljából készült. A munka távlati célja egy, a soron következő irányított transzpozon-mutagenézishez és egy esetleges élő baromfi vakcina előállításához alkalmas törzs keresése volt.

A vizsgálataink során kapott eredmények azt bizonyítják, hogy a flagellin tesztelő PCR rendszer működik, képes az összes vizsgálat alá vont szerovariánsból (*S. Abortusequi*, *S. Hadar*, *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Gallinarum*) kimutatni a flagellin géneket. A PCR-es vizsgálatok megerősítették a jól ismert szerológiai adatokat a bifázisos *S. Typhimurium* és *S. Hadar* és a monofázisos *S. Enteritidis* esetében. A teljes flagellin rendszer detektálható volt a vizsgált *S. Typhimurium* és *S. Hadar* törzsek esetében, míg a tesztelt *S. Enteritidis* törzsekben csak a H1 fázist kódoló *fliC* gén és annak operátora volt megtalálható.

PCR rendszerünkkel a monofázisos *S. Abortusequi* törzsekben is sikerült kimutatni a H2 fázis mellett a kriptikus, nem expersszálódó H1 flagellinfázis génjét a *fliC*-t is. Szintén sikerült megtalálni a *fliC* gént és a szabályozó rendszer maradványait a mozgásképtelen *S. Gallinarum* törzsekből, amelyeken szerológiai módszerekkel flagellin nem detektálható.

A további vakcina fejlesztési munkák céljából a baromfi eredetű *Salmonella* Enteritidis E 296 (a későbbiekben: *Salmonella* Enteritidis 11-nek jelzett) törzset választottuk. Az SE11 jelű törzs rendelkezik az Enteritidis törzsek azon előnyös tulajdonságával, hogy monofázisos, csak egy flagellin génje van (*fliC*), ugyanakkor a flagellin génje előtt megtalálható az FljA represszor kötési helye, a *fliC* operátor szekvencia.

A fenti tulajdonságok az SE11 törzset a soron következő, flagelláris génekre irányított transzpozon mutagenézishez ideális alannyá teszik.

3. Flagellin bénítás *Salmonella* Enteritidisben irányított transzpozon mutagenezis segítségével

3.1. Bevezetés

3.1.1. Flagellinek, mint markerek

Amint a dolgozat bevezetőjében már kifejtettük, a *Salmonella* elleni vakcinázási lehetőségek közül hatékonyságuk miatt egyre inkább az élő, orális vakcinák kerülnek előtérbe az elölt vakcinákkal szemben. Az élő vakcinákkal való védekezés során azonban nagymennyiségű élő *Salmonella* baktérium kerül az állatok bélrendszerébe, majd ezen keresztül a környezetbe. Az állatokba és a környezetbe kerülő vakcina törzseknek ezért természetesen ártalmatlannak kell lenniük, de legalább ennyire fontos az is, hogy a vad törzsektől egyértelműen elkülöníthetők legyenek.

Az elkülöníthetőség érdekében számos módon jelölni lehet a vakcina törzseket, így elképzelhetők genetikai, biokémiai vagy szerológiai jelölések. A felsorolt lehetőségek közül talán a szerológiai markerezés a legkézenfekvőbb, hiszen a vad törzsektől a *Salmonella* vakcina áthangoló hatásán keresztül is megkülönböztethető. Így egy „szerológiai jelöléssel” ellátott törzssel immunizált állományról már az első diagnosztikai lépések során kiderülhet, hogy vakcina-, vagy vad törzs okozta áthangolódásról van-e szó.

A „szerológiai jelölés” legegyszerűbb módja, ha negatív fehérjemarkerrel látjuk el a baktériumot, vagyis egy jó antigenitású sejtfelszíni fehérjét eliminálunk a vakcinajelölt törzsről. E célból megfelelőnek tűnt a *Salmonella* Enteritidis esetében a flagellin fehérjét megcélolni, nem csak jó antigenitása miatt, hanem monofázisos szerovariánsról lévén szó az egyetlen flagellin gén esetleges kiütése nem mozgó fenotípust eredményez, makroszkópicusan vizsgálható markerrel látva el a törzset.

Az előző fejezetben vizsgált *S. Enteritidis* törzsek mellett, hogy monofázisosak voltak, DNS szinten is csak egyetlen flagellin gént hordoztak, a *fliC*-t. Ez a jellegzetesség, az *fliA* represszor hiányával és az operátor szekvencia jelenlétével együtt, optimális célszervezetté teszi a *S. Enteritidis* az irányított transzpozon-mutagenezis végrehajtására.

3.1.2. Transzpozonokon alapuló mutagenézis rendszerek

A mobilis genetikai elemek (IS elemek, transzpozonok) mint mozgékony, áthelyeződésre képes DNS szakaszok, képesek a gazdaszervezet genomjába integrálódni, és ott mutációkat létrehozni. Ezzel a genom kutatásának és átalakításának kiváló eszközei lehetnek. Az inszerciók által generált mutációknak igen fontos előnye, hogy nem csupán fenotípusuk detektálható, hanem egyúttal "fizikailag" is megjelölik a mutáns gént. Ily módon hatékony inszerciós mutagenézist tesznek lehetővé, melynek révén mutációkat hoznak létre vagy véletlenszerűen, vagy közel véletlenszerűen, ez utóbbi esetben mutációs célpontként kiválasztva bizonyos szekvencia-mintázatokat („hot-spot”).

A bakteriális eredetű IS30 inszerciós szekvencia (Dalrymple és mts. 1984) egy részletesen tanulmányozott mozgékony elem, mely 1221 bp hosszú és egyetlen nagy nyitott leolvasási kerete a 44,3 kDa méretű transzpozáz fehérjét kódolja. Az elem két szélén 26 bázispár hosszúságú IR végek (inverted repeat, fordított irányú ismétlődés) találhatóak. Génátrendezés esetén az IR végek mellett hasítódik ki az elem. Azonban ezt a reakciót megelőzi az elem igen aktív transzpozíciós intermedier formájának kialakulása (Olasz és mtsai, 1993, Kiss és Olasz 1999), amely két azonos orientációban egymáshoz kapcsolódó IS elemből áll – jelölése: (IS30)₂ –, amely közel 1000-szer nagyobb transzpozíciós gyakorisággal jellemezhető, mint a monomer forma. A transzpozíció során az (IS30)₂ struktúra megoldódik, s az így kialakult inszerciós termék már stabil.

Az IS30 rendelkezik saját targetspecifitással. A „hot spot” szekvenciái egy konszenzussal jellemezhetőek, amely azonban a legtöbb pozícióban nem szigorúan meghatározott (Olasz és mtsai, 1998).

A transzpozáz fehérje, amely a reakciót katalizálja, mind cisz, mind transz helyzetben aktív, ami azt jelenti, hogy a transzpozáz gén az aktív (IS30)₂ struktúrától különválasztható.

3.1.3. Az irányított mutagenézis rendszer felépítése

Az általunk itt kidolgozott mutagenézis rendszerrel célunk volt, hogy az IS30 transzpozáz célszekvencia specifitásának irányt szabjunk azáltal, hogy az FljA flagellin represszor (DNS-kötő) fehérjét kapcsoljuk hozzá. Ezzel egy olyan transzpozon inszerciós mutagenézis rendszert kívántunk létrehozni, amely képes az inszerciókat a *fliC* operátor régióra – ami az

FljA represszor felismerő helye – és annak közvetlen környezetében lévő flagellin génekre irányítani.

A transzpozíció irányultságát biztosító fúziós fehérje tehát a következő két esszenciális doménből állt:

- i.) DNS kötő domén: FljA represszor fehérje mely felelős a *fliC* operátor célszekvencia felismeréséért.
- ii.) A transzpozáz domén: IS30 transzpozáz fehérje, amely az integráció lejátszódásáért felelős.

Maga a rendszer három funkcionális komponensből állt:

- 1.) Célszekvencia: *fliC* operátor, amely megfelel az FljA represszor fehérje által felismerendő szekvenciának. Ez a szekvencia a *fliC* és *fliD* gének által határoltan helyezkedik el a *Salmonella* kromoszómán.
- 2.) A fentebb ismertetett FljA-IS30 fúziós fehérje, amely egy e célból bejuttatott plazmid DNS-ről szintetizálódik és az integrációs donor szekvencia beépítését végzi a célszekvenciába.
- 3.) Integrációs donor szekvencia, amely a transzpozáz aktív helyét (az (IS30)₂ struktúra) egy marker génnel (Cm^R) kapcsoltan tartalmazza, s egy második, „donor” plazmidon helyezkedik el (lásd később az 5. ábrán). Ez a plazmid integrálódik a célszekvenciába.

Célok

A fenti mutagenézis rendszerrel végzett kísérleti munka célja egy megfelelő negatív fehérje markerrel ellátott *Salmonella* Enteritidis mutáns előállítása volt, amely a munka későbbi fázisában egy élő, orális baromfi vakcina alapjául szolgálhat. A mutagenézis célpontját a H antigén termelődésért felelős flagellin gének – elsősorban a *fliC* operátor és környezete – jelentik. A feladatot egy új megközelítéssel – irányított transzpozícióval – terveztük végrehajtani.

3.2. Anyagok és módszerek

3.2.1. Baktériumtörzsek

TG1: *Escherichia coli* K-12 *supE hsdD5 thiΔ(lac-proAB) F'(traD36 proAB⁺ lacI^f lacZΔM15)* (Gibson, 1984)

S17-1 λ pir: *Escherichia coli* K-12 konjugatív törzs, *pro thi recA λpir hsdR* ($r^- m^+$) $Tp^R Sm^R$ [Ω RP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7] (Simon és mtsai, 1983)

SE11: *Salmonella* Enteritidis 11, 1-es fágtípusú, baromfi eredetű vad törzs

3.2.2. Táptalajok, antibiotikumok

Bakteriális táptalajként LB tápfolyadékot és agart (Sambrook és mtsai., 1989) használtunk. Elektroporálás után a sejtek regenerálásához SOC médiumot (Sambrook és mtsai., 1989) használtunk. Az antibiotikumokat (Sigma) minden esetben az alábbi koncentrációban használtuk: ampicillin (Ap): 150 μ g/ml, kloramfenikol (Cm): 20 μ g/ml.

3.2.3. Plazmidok

A munkánk során felhasznált és előállított plazmidok leírását az Eredmények fejezetben közöljük.

3.2.4. Standard mikrobiológiai és molekuláris biológiai eljárások

A külön nem részletezett molekuláris biológiai módszereket és a szükséges oldatokat Sambrook és mtsai. (1989) szerint alkalmaztuk.

Enzimek

A polimeráz láncreakcióhoz *Pwo* polimerázt (Roche), vagy *Taq* polimerázt (MBI Fermentas) használtunk.

A kísérletek során használt restrikciós endonukleázok (*Bam*HI, *Bgl*II, *Bgl*III, *Cla*I, *Eco*RI, *Eco*RV, *Hind*III, *Pst*I, *Sal*I, *Xba*I, *Xho*I) az MBI Fermentas valamint a Boehringer-Mannheim

cégek termékei. A restrikciós emésztésekhez ugyancsak a Fermentas illetve a Boehringer-Mannheim féle pufferrendszereket használtuk.

Az általunk használt T4 DNS ligáz enzim az MBI Fermentas terméke volt.

Polimeráz láncreakció (PCR)

A PCR-rel előállított klónozendó fragmentumok amplifikálásához hibajavító aktivitással is rendelkező *Pwo* polimerázt, míg a tesztelésekhez *Taq* polimerázt használtunk. A PCR paraméterei az előző fejezet 2.2.2. pontjában leírtakkal azonosak voltak. Az *fljA* gén klónozásához használt *fljANtermPstfor* és *fljACtermPstrev* primerek szekvenciái a II. táblázatban találhatóak.

Plazmid DNS tisztítás

A Birnboim-Dolly féle lúgos gyors plazmid izolálás szerint (Birnboim és Dolly, 1979) történt:

- *E. coli* sejteket 2 ml antibiotikumtartalmú LB-ben egy éjszakán át növesztettük
- 1,5 ml-t Eppendorf csőbe öntve centrifugáltuk (2', 10000 g)
- 100 µl lízis (I-es) oldatban felszuszpendáltuk, 10' inkubálás jégen
- 200 µl alkalikus SDS (II-es) oldatot hozzáadva óvatosan kevertük, 5' inkubálás szobahőn
- 150 µl 3 M nátrium-acetát (III-as) oldatot (pH 4,8) hozzáadtunk, 15' inkubálás jégen
- centrifugálás (15', 12000 g), felülúszóhoz 1 ml tömény etanolt adva inkubáltuk: 15' -20 °C
- centrifugálás (15', 12000 g)
- a kiülepedett DNS-t kétszer 70%-os etanollal mostuk
- szárítás, feloldás 70 µl TE-ben

Restrikciós emésztés

1-5 µl plazmid DNS-t, amely 50-200 ng DNS-nek felel meg (Birnboim-Dolly módszer szerint tisztítva)

2 µl puffert (Boehringer-Mannheim vagy Fermentas pufferrendszer szerint)

10 egység (1 µl) restrikciós endonukleázt (kettős emésztésnél 1 µl a másik enzimből is) desztillált vízzel 20 µl-re kiegészítettünk

Ligálás

- 2 µl (kb. 20-50 ng) vektor DNS-t
- 5 µl (kb. 100-200 ng) fragment DNS-t
- 2 µl ligáz puffert
- 1 µl (5 egység) T4 ligáz enzimet
- 10 µl H₂O-t összekevertünk, egy éjszakán át inkubáltuk 15 C°-on.

Elektrokompetens sejtek készítése

- 200 ml LB-ben antibiotikum mellett (ha szükséges volt) növesztettük a sejteket, míg elérték a 600 nm-en mért 0,5-0,8 közötti optikai denzitást.
- 15 percig 5000 g-vel 4 C°-on centrifugáltuk.
- A sejteket szuszpendáltuk 200 ml ionmentes vízben.
- 15 percig 6000 g-vel 4 C°-on centrifugáltuk.
- Szuszpendálás 100 ml ionmentes vízben.
- 15 percig 6000 g-vel 4 C°-on centrifugáltuk.
- Ismét szuszpendáltuk 100 ml ionmentes vízben.
- 15 percig 6000 g 4 C°-on centrifugáltuk.
- A sejteket 4 ml 10%-os glicerin oldattal mostuk
- 20 percig 7000 g 4 C°-on centrifugáltuk.
- A sejteket 0,4 ml 10%-os glicerin oldatban felszuszpendáltuk
- Az így elkészült kompetens sejteket 40 µl-enként Eppendorf csövekbe széosztva -70 C°-on tároltuk.

Elektroporációs transzformálás

- A plazmid DNS preparátum 1 µl-ét hozzáadtuk 40µl kompetens sejthez
- A keveréket 2 mm elektród távú speciális, elektroporáláshoz alkalmas küvettába helyeztük át, majd
- Az elektroporátor (BTX) beállítása után (50µF kapacitás, 129Ω ellenállás), a fegyverzeteken eső 0,9 kV feszültséggel sokkoltuk.
- Elektromos sokk után, a baktériumokat SOC közegben, 1,5 órán át, 37°C-on, közepes erősséggel rázatva növesztettük.
- A transzformált sejteket különböző hígításban a megfelelő antibiotikumot tartalmazó LB lemezekre szélesztettük, s a lemezeket 37°C-on, éjszakán át inkubáltuk.

A fúziós fehérje termelődésének ellenőrzése

- A fehérje termelő baktérium egy éjszakás levestenyészetéből 0,5 ml-t átoltottuk 4,5 ml, antibiotikummal kiegészített LB táplevesbe, majd egy órán át rázatva inkubáltuk 37°C-on.
- Az így felfrissített tenyészetet két 2 ml-es részre osztjuk, melyek közül az egyiket 10 µl 100 mM-os IPTG oldattal indukáltuk. Az indukálatlan és az IPTG-vel indukált tenyészeteket tovább inkubáltuk 3 órán át, 37 °C-on.
- A baktérium tenyészeteket 0,5 ml fiziológiás sóoldattal mostuk.
- A mosott tenyészetet felvettük 200 µl SDS mintapufferben, melyet 20 µl merkeptoetanollal egészítettünk ki.
- A teljes fehérje kivonáshoz a szuszpenziót 5 percig forraltuk.
- Az így nyert minták 3 µl-ét 8%-os poliakrilamid gélen futtattuk
- A gélt Coomassie Brilliant Blue festékkel festettük.

3.2.5. Szekvencia analízis

A GCG program-csomag (Wisconsin Package Version 10.2) felhasználásával történt. A szekvenciák összehasonlítását NCBI GenBank adatbanki adatokkal az NCBI BLAST szoftvercsomag blastx (BLAST Nucleotide query - Protein db), blastn (standard nucleotide-nucleotide BLAST) és BLAST 2 Sequences similarity search (Altschul és mtsai. 1990) programjaival végeztük.

3.2.6. Transzpozon mutagenézis baktérium konjugációval

1. A donor és recipiens törzsek leoltása ferde agarról a megfelelő antibiotikumokkal kiegészített 2 ml LB levesbe .
2. Inkubáció, 37°C, O/N, rázatva
3. Centrifugáltuk a tenyészetek 1,5 ml-ét 10000 rpm-en, 5 percig (összegyűjtjük a sejteket).
4. Mostuk a sejteket 1 ml steril fiziológiás sóoldattal, hogy megszabaduljunk az antibiotikumok maradványaitól.
5. Centrifugálás 10000 rpm-en, 5 percig.
6. Reszuszpendáltuk a sejteket 1 ml steril fiziológiás sóoldattal.

7. Konjugációs lépés: összekevertünk 100 µl donor és 100 µl recipiens tenyészetet steril üvegbottal egy antibiotikum mentes LB agar felszínén. Kontrollként a donor és a recipiens törzs szintenyészetét külön is szélesztettük.
8. Inkubáció, 37°C, 5 óra
9. Az öt óra alatt kinőtt baktérium pázsitot 3 ml steril fiziológiás sóoldattal lemostuk, majd tízes léptékű hígítási sort készítettünk négy lépésig.
10. Az egyes (1., 2., 3. és 4.) hígítási lépésekből Ap, Cm tartalmú LB lemezekre 100-100 µl-t szélesztettünk.
11. Inkubáció, 37°C, O/N
12. A konjugáció eredményeként kinőtt izolált telepeket megszámloltuk, hogy meghatározzuk az összes, a donor, a recipiens és a transzkonjugánsok csíraszámát, majd a transzkonjugáns telepeket steril fogpiszkálóval átoltottuk Ap, Cm tartalmú LB lemezekre, hogy az esetleges donor és recipiens maradványoktól biztosan megszabaduljunk.

3.2.7. Motilitás teszt

A transzpozon mutagenézis eredményeként kinőtt Ap^R és Cm^R *Salmonella* Enteritidis mutánsok mozgáskéességét lágyagaros teszttel vizsgáltuk. Az egyes mutánsokat az izolált telepről levágott végű tűszerű oltókaccsal szelektív (Ap + Cm) LB 0,1% agart tartalmazó csövek felső harmadába szúrtuk. 24 óra 37°C-on történő inkubálás után a baktériumok mozgáskéességét vizsgáltuk.

3.3. Eredmények

3.3.1. Előzetes kísérleti eredmények

Amint azt a 2.3. fejezetben már részletesen ismertettük, az irányított mutagenézis előkísérleteiként öt *Salmonella* szerovariáns több, mint 70 törzsét vizsgáltuk meg különböző flagellin gének jelenlétére. A megvizsgált öt szerovariáns (*S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Hadar*, *S. Gallinarum* és *S. Abortusequi*) előszűrése a mutagenézis szempontjából fontos *fljB*, *hin*, *hixL*, *hixR*, *fliC*, *fliC* operátor és *fljA* szekvenciákra irányult. A vizsgálatok azt mutatták, hogy a *S. Enteritidis* törzsekben, (ellentétben a tesztelt mozgásképes egyéb *Salmonella* szerovariánsok mindegyikével, így a *S. Typhimurium*mal) csak egyetlen flagellin gén, a *fliC* és a *fliC* operátor szekvenciája van jelen (2.3. fejezet, III. táblázat), mely utóbbi egyben az FljA represszor fehérje kötődési helye.

Az, hogy a *S. Enteritidis* csak egy flagellin génnel rendelkezik, s hogy ugyanakkor e mellett a gén mellett jelen van az FljA kötőhelye (a *fliC* operátor), ideális mutagenézis célponttá teszi ezt a szerovariánst.

3.3.2. A mutagenézis rendszer kidolgozása

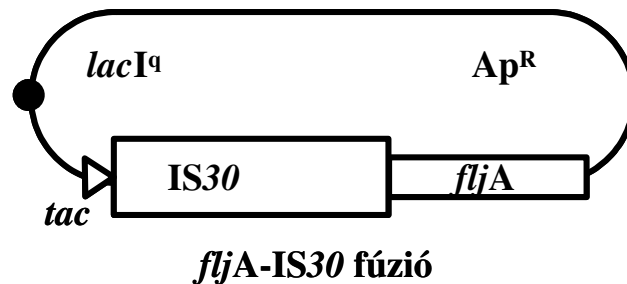
Az előzőekben leírtak alapján a *S. Enteritidis* *fliC* génjének irányított transzpozon mutagenézisére koncentráltunk, mely régióban célszekvenciaként a *fliC* gén operátora szerepel.

A transzpozáz termelő konstrukciót (6. ábra) úgy hoztuk létre, hogy az IS30 transzpozáz C-terminális régiójához fuzionáltuk a *fliC* operátor represszorát, az FljA-t kódoló szakaszt. Ehhez alapvektorként rendelkezésre állt az Amp^R pJKI132 plazmid (Farkas és mts. 1996) melyben az IS30 transzpozáz gén expressziója egy indukálható *tac* promóter kontrollja alatt áll. Irányított mutagenézissel az IS30 utolsó kódonja után a megfelelő leolvasási keretbe egy *PstI* hasítóhely került beépítésre, így lehetővé vált erre a helyre gének klónozása. Első lépésként az *fljA* gént amplifikáltuk úgy, hogy a PCR-hez használt primerek 5' végei a megfelelő leolvasási keretben tartalmazták a klónozáshoz szükséges *PstI* hasítóhelyeket.

A fúziós transzpozázt termelő pFOL1111 plazmid (6. ábra) készítésekor a pJKI132 plazmid *HindIII* helyén a 0,78 kb-os *HindIII* fragmentet cseréltük a pMSZ165 (Szabó és mtsai., 2003) 1,3 kb-os fragmentjére. Ez utóbbi tartalmazta a az IS30 utolsó kódonja után a megfelelő

leolvasási keretben a *PstI* hasítóhelyet – ez a konstrukció a pFOL1070. A pFOL1070 *PstI* helyére klónoztuk az *fljA* gént tartalmazó PCR fragmentet.

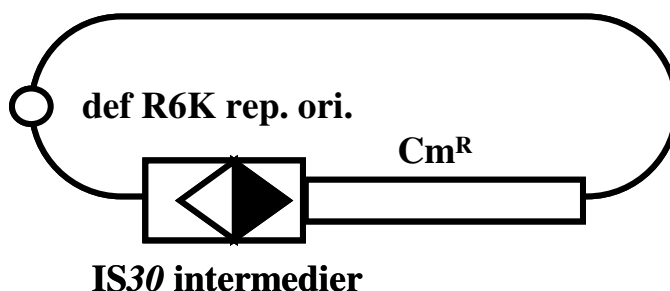
Bizonyítandó, hogy a klónozott *fljA* gén nem tartalmaz mutációt és a megfelelő leolvasási keretben csatlakozik az IS30 transzpozáz génhez, az *fljA* szekvenciáját meghatároztuk és számítógépes szekvencia-analízissel ellenőriztük.



6. ábra A fúziós transzpozázt termelő pFOL1111 plazmid szerkezete. Az ampicillin rezisztencia markerrel ellátott plazmid a *tac* promóter kontrollja mellett termeli a fúziós FljA-IS30 fehérjét.

Az integrációs donor szekvenciának egyrészt tartalmaznia kell a transzpozícióban aktív (IS30)₂ struktúrát (de aktív transzpozáz nélkül), másrészt egy marker gént. Célszerű, ha a konstrukció konjugatív plazmid, azaz képes átjutni a mutagenizálni kívánt baktériumba, ám ott nem képes replikációra. Ezek a járulékos tulajdonságok a későbbi tesztelési eljárásokat nagy mértékben megkönnyítik, mivel nem kell számolni a plazmid fennmaradásával. Ezért mi a pLOFKm alap plazmidból (Herrero és mtsai, 1990) több lépésben állítottuk elő a felhasználni kívánt konstrukciót, a konjugatív pFOL1069 plazmidot, mely Cm^R rezisztenciát hordoz. Ez a konstrukció csak az S17-1 λ -*pir* *E. coli* törzsben képes replikációra, más *E. coli* törzsekben és *Salmonella* Enteritidisben nem (7. ábra).

***Mob* funkciók**

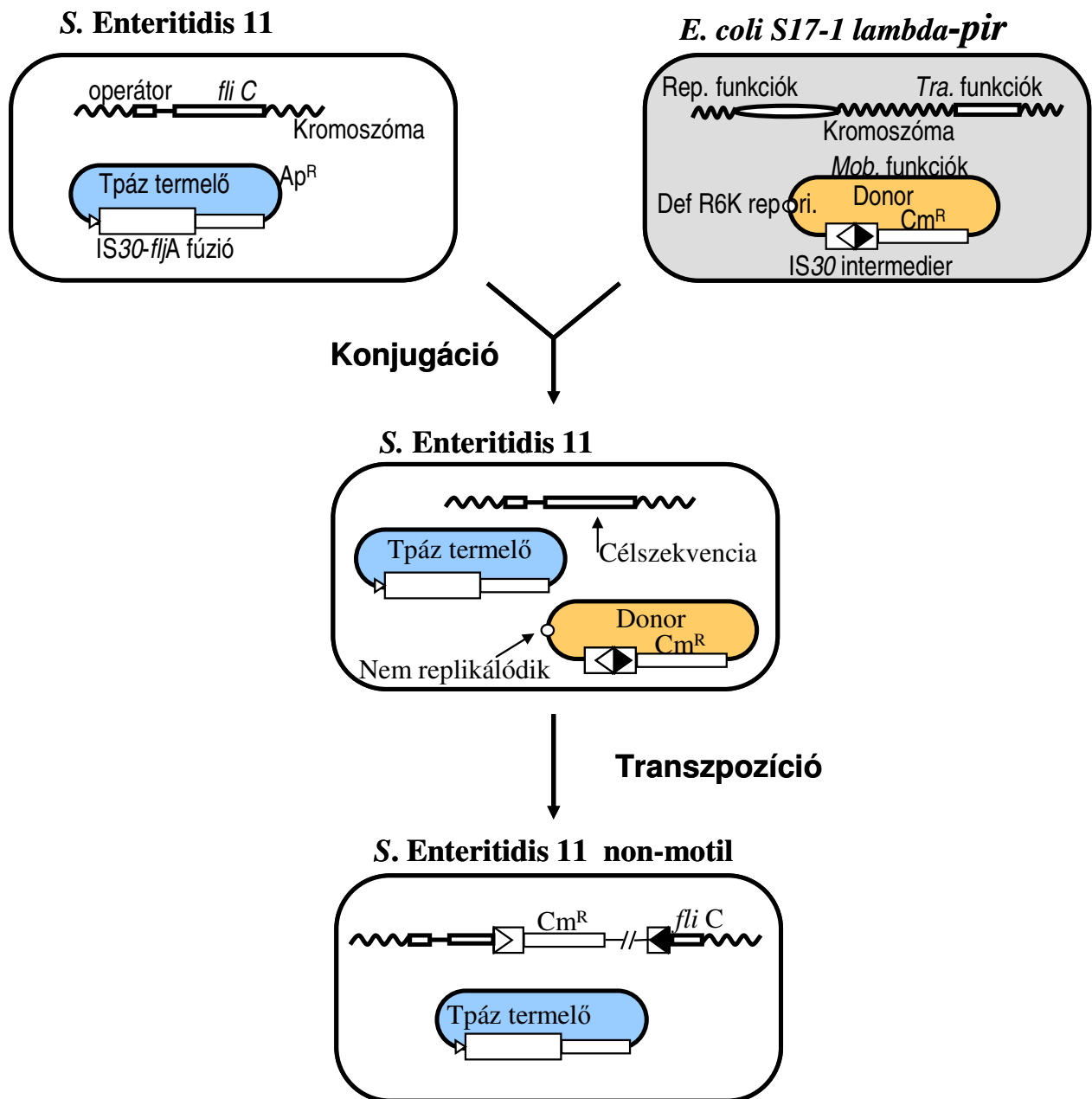


7. ábra A transzpozíciós donor pFOL1069 plazmid szerkezete. A konstrukció tartalmazza a reaktív (IS30)₂ intermedier struktúrát, a konjugációért felelős *mob* géneket és a kloramfenikol rezisztencia gént. Replikációs origója a defektív R6K, amelynek működéséhez a λ -*pir* funkciók szükségesek.

3.3.3. Irányított mutagenézis kísérletek

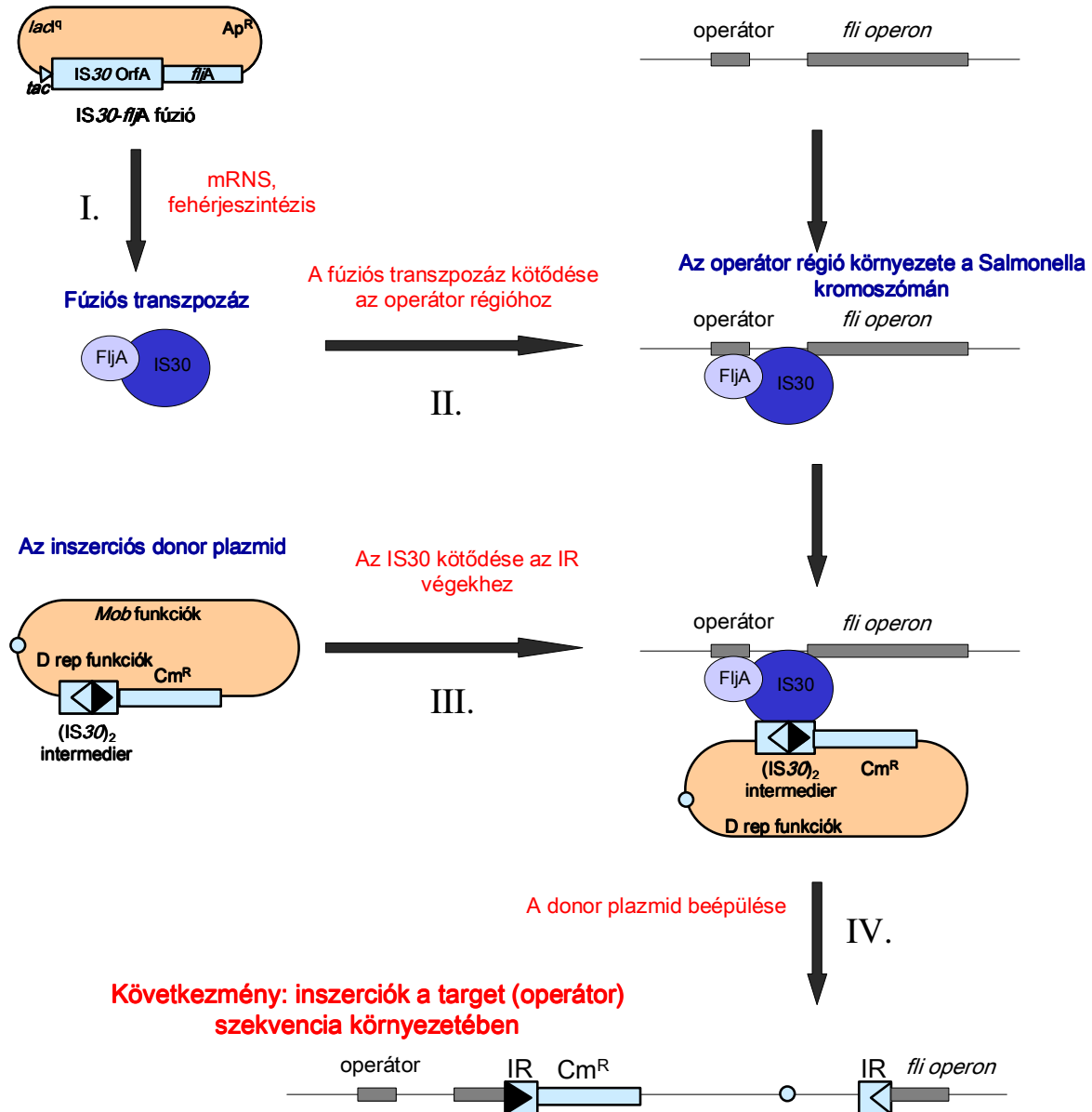
A rendszer elméleti működését az 8. ábra szemlélteti, mely szerint a mutagenézis kísérleteket a következőképpen végeztük.

A fúziós transzpozáz termelő pFOL1111 konstrukciót (Ap^R) elektroporációval bejuttattuk az SE11 *Salmonella* Enteritidis törzsbe. Hogy megbizonyosodjunk arról, hogy a transzpozáz fehérje IPTG indukció hatására termelődik, a sejteket IPTG indukció után feltártuk és SDS-PAGE gélelektroforézissal győződünk meg a transzpozáz fehérje indukciójáról. Ez megteremti a feltételét annak, hogy ha konjugációval bejuttatjuk a pFOL1069 integrációs donor konstrukciót is (amely nem tartalmaz transzpozáz gént, s nem képes replikációra *Salmonella* törzsekben), akkor az integrálódni fog a bakteriális kromoszómára. Az integrációt a Ap^R, Cm^R *Salmonella* telepek megjelenése jelzi.



8A. ábra Az irányított transzpozíció menete. A folyamat első lépéseként bakteriális konjugáció során az integrációs donor szekvenciát hordozó pFOL1069 plazmid átjut a *S. Enteritidis 11*-be. Az SE11-ben a konjugáció időpontjában már jelen van a fúziós (IS30-*FliA*) transzpozáz fehérje (mely a pFOL1111 plazmidról termelődik), így az IS30 intermedier megjelenésekor gyorsan lejátsszódik a transzpozíciós reakció. Mivel a pFOL1069 nem képes replikálódni a recipiensben, ezért a kloramfenikol rezisztens *Salmonella* telepekre szelektálva az inszerciós mutánsokat kapjuk.

Az irányított transzpozíció elve



8B. ábra Az irányított mutagenézis elve. I. A fúziós IS30-FliA fehérje termelődik a pFOL1111 plazmidról. II. A fúziós transzpozáz kötődik az FliA célszekvenciájához, a *fliC* operátorhoz. III. A fúziós transzpozáz szintén köti az inszerációs donor pFOL1069 plazmidot a reaktív (IS30)₂ intermedieren keresztül. IV. Az inszeráció során a teljes donor plazmid a célszekvenciába épül, ezzel mutációt okozva a *fliC* operátor környezetében.

Elvégezve a kísérletet (8. ábra) megállapíthattuk, hogy a kontroll kísérletekben (donor és recipiens csak önmagában van jelen) nem, vagy csak elhanyagolható mértékben kaptunk Cm^R *Salmonella* telepeket. Amikor viszont mind a transzpozáz termelő, mind az integrációs donor jelen volt, akkor a transzpozíciós gyakoriság, 10⁻⁴ érték körül mozgott több független kísérletben. A rendszer tehát reprodukálhatóan működött (IV. táblázat).

Kontrollként olyan izogénikus transzpozíciós rendszert használtunk, ahol az IS30 transzpozáz nem fuzionáltattuk semmilyen DNS-kötő fehérjével (pJKII32, vad típusú IS30 transzpozáz termelő plazmid), azaz ebben az esetben nem beszélhetünk irányításról. A mutációs gyakoriság tekintetében a kontroll és az irányított transzpozíciós rendszer között nem tapasztaltunk eltérést.

IV. táblázat Az irányított (FljA-IS30) és a vad (IS30) transzpozáz transzpozíciós gyakoriságai *S. Enteritidis* 11 jelű törzsben. (A konjugációs donor törzs minden esetben az *E. coli* S17-1 λ pir pFOL1069 Cm^R törzs volt.)

Különböző transzpozáz termelő recipiens törzsek:	Teljes csíraszám log CFU/ml:	Mutáns csíraszám (Ap ^R , Cm ^R) log CFU/ml:	Transzpozíciós gyakoriság:
SE11	10,48	<1,00	<-9,48
SE11+FljA-IS30	10,27	6,48	-3,79
SE11+FljA-IS30	10,39	6,64	-3,75
SE11+FljA-IS30	10,16	6,39	-3,77
SE11+IS30	10,06	5,98	-4,08
SE11+IS30	10,20	6,19	-4,01
SE11+IS30	10,12	6,28	-3,84

3.3.4. Az izolált mutánsok analízise

A mutagenézis során összesen 1200 Ap^R, Cm^R *Salmonella* telepet izoláltunk. Ezek közül 600 egyedi mutáns az FljA-IS30 fúziós transzpozázzal végzett kísérletből-, másik 600 pedig a vad típusú IS30 transzpozázzal végzett kontroll kísérletből származott. Ezek mindegyikét fenotípusosan vizsgáltuk, azaz motilitásukat egyedi lágyagáros csökísérlettel teszteltük. Az eredmények szerint a fúziós transzpozázzal nyert mutánsok döntő többsége, több mint 50 %-a sérült motilitást mutatott, és ezek közül négy teljesen mozgásképtelennek bizonyult (9. ábra).

Ezzel szemben a kontroll kísérletben a csökkent motilitásúak aránya nem haladta meg a 2,5%-ot, nem mozgó mutánst pedig egyáltalán nem találtunk (V. táblázat).

V. táblázat A fúziós és a vad transzpozázal előállított mutánsok mozgásképesége

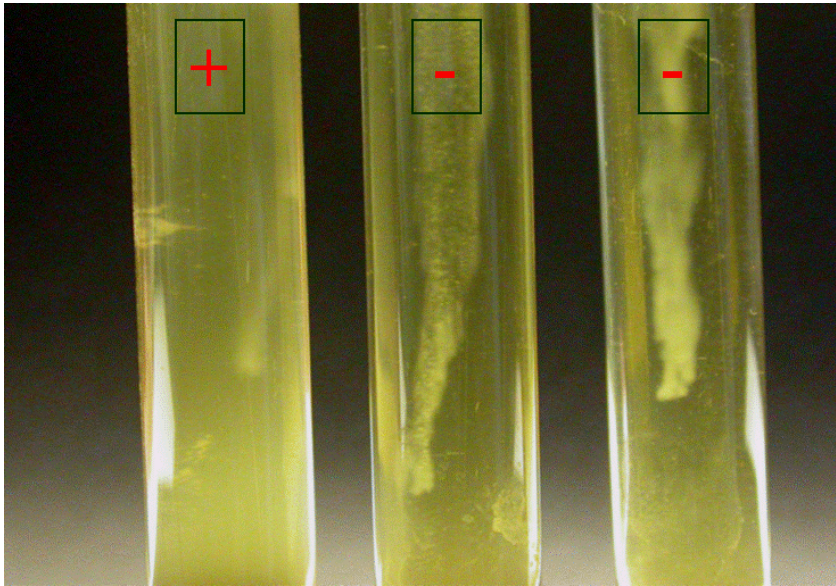
A mutáns fenotípusok megoszlása a módosított transzpozáz esetében:

Nem mozgó:	Gyengén mozgó:	Mozgó (vad):	Összesen:
4	309	287	600
0,7 %	51,5 %	47,8 %	100 %

A kontroll (vad transzpozáz) esetében:

Nem mozgó:	Gyengén mozgó:	Mozgó (vad):	Összesen:
0	13	587	600
0 %	2,2 %	97,8 %	100 %

Az izolált mutánsok analízise során számos esetben klónoztuk és szekvenáltuk a beépülés helyét, elsősorban azokra az esetekre koncentrálva, amikor nem mozgó és csökkent motilitású mutánsokról volt szó. A négy nem mozgó mutáns közül három esetben az inszerció a *fliD* génben következett be. A *fliD* a bakteriális csilló kampójának felépítésében játszik szerepet („hook associated protein”), és fizikailag közvetlenül a *fliC* operátora mellett helyezkedik el. A negyedik nem mozgó mutáns esetében a szekvencia adatok szerint az inszerció az *yjjY* elnevezésű, ismeretlen funkciójú ORF-ben következett be. Az *yjjY* gén terméke a feltételezések szerint egy belső membrán fehérje, amelynek mutációja önmagában nem magyarázza a mozgásképtelen fenotípus megjelenését, azonban egy rejtett, nem azonosított, mozgásért felelős génben meglévő mutáció lehetősége ebben a mutánsban nem zárható ki.



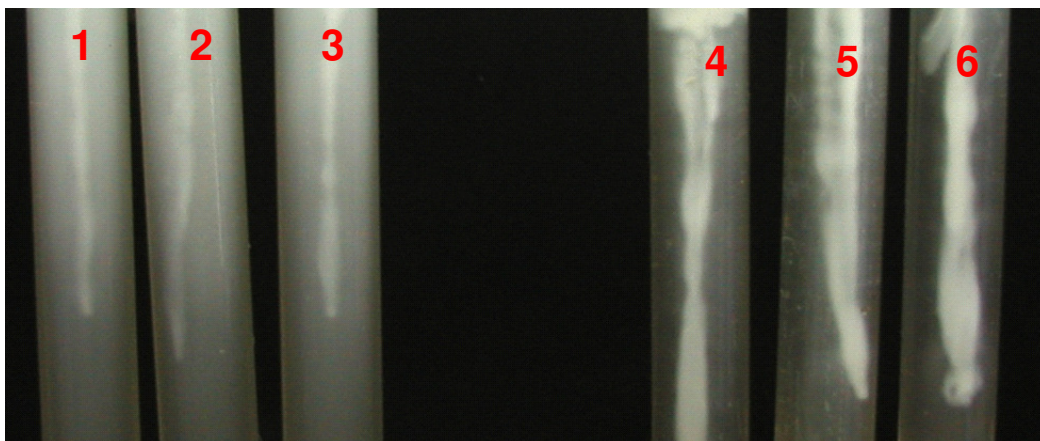
9. ábra A vad típusú (+) és a nem mozgó (-), *fliD* mutáns *Salmonella* Enteritidis 11 törzsek lágyagaros csőbe oltva. A nem mozgó mutánsok szaporodása a szűrési csatornára korlátozódik.

A csökkent motilitású mutánsokban az inszerciók jelentős része egy „forró találati helyet” (hot spot) reprezentál, ami szintén a fent említett *yjyY* génnel azonosítható (10 szekvenált izolátum – VII táblázat). Miután a szekvenált, gyengén mozgó mutánsok között nagy számban találtuk meg az *yjyY* mutánst, tesztelő primereket terveztünk az itt bekövetkezett inszerció azonosítására. Ezel a PCR-rel nagy számban találtunk *yjyY* mutánsokat nem csak a gyengén mozgó, de a motilis kategóriában is, a fúziós transzpozázssal előállított mutánsok között. Az inszerciós helyek szekvenciája azonban limitált homológiát mutat az IS30-ra jellemző konszenzus, ún. CIG szekvenciával (VI. táblázat) (Olasz és mts. 1998). A gyengén mozgó mutánsok beépülési helyei között sok olyat is találtunk, amelyek csak egy vagy két esetben fordultak elő. Így mutációt detektáltunk számos ismert: *yfM*, *caiC*, *invG*, *malt*, *trkA* és feltételezett: *STM0042*, *STM1133*, *STM1251*, *STM2588*, *STM4463*, *STM4465* gén szekvenciájában is (VII. táblázat).

3.3.5. Az FljA-IS30 fúziós transzpozáz fenotípusos hatása

Mínt hogy a gyengén mozgó mutánsok esetében többnyire olyan génekben történt inszerció, amelyek nem, vagy csak közvetve hozhatók összefüggésbe a mozgékonyssággal, felmerült a gyanú, hogy a motilitás csökkenésért nem minden esetben az elszenvedett mutáció, hanem esetleg a bevitt és nagy mennyiségben termelődő fúziós FljA represszor fehérje felelős. Ez a gátló fehérje ugyanis - amely *S. Enteritidis*-ben természetes körülmények között nincs jelen - éppen a *fliC* gén gátlását végzi. Így egy olyan szerovariánsban, ahol ez az egyetlen flagellin gén van jelen az FljA-IS30 fúziós fehérje csökkent motilitást eredményezhet. Ezt a lehetőséget tisztázandó kontroll kísérletet terveztünk, amelyben a vad IS30 és a fúziós FljA-IS30 transzpozáz az SE11 törzs mozgásképessegre gyakorolt hatását vizsgáltuk úgy, hogy az inszerció donor szekvencia (pFOL1069) nem volt jelen a rendszerben, tehát mutáció nem történhetett.

A kísérlet eredményeként azt tapasztaltuk, hogy míg a vad IS30 jelenléte esetén nem változik a törzs fenotípusa, addig a fúziós transzpozáz jelentősen képes csökkenteni a mozgásképesseget *Salmonella* Enteritidis 11 törzsben (10. ábra). Ez a represszor hatásnak köszönhető csökkent motilitás az idő előrehaladtával viszont egyre kevésbé kifejezett, és 48 óra elteltével a vad típustól elkülöníthetetlené válik a lágyagarba oltott törzs.



10. ábra A vad típusú transzpozáz (1, 2, 3) és a fúziós, FljA-IS30 transzpozáz (4, 5, 6) motilitásra gyakorolt hatása a *S. Enteritidis* 11 törzsben.

Fontos hangsúlyozni, hogy a represszor okozta csökkent motilitás csak szelektív lágyagárban figyelhető meg. Szintén kiemelendő, hogy a teljesen mozgásképtelen mutánsok - amelyeket csak az irányított transzpozíció segítségével sikerült előállítani – jól megkülönböztethetőek a represszor hatást elszenvedő törzstől. A flagellin mutánsok fenotípusával szemben a represszor okozta mozgáscsökkenés jóval gyengébb és fokozatosan elmúló jelenség, így a lágyagáros mozgásteszt megfelelő módszer az irányított transzpozázzal létrehozott mutánsok szelekciójára.

3.4. Megbeszélés

A mobilis genetikai elemek, transzpozonok a genetikai eszköztár régóta ismert és alkalmazott eszközei. Mivel képesek a gazdaszervezet genomjába integrálódni, a genom kutatásának és átalakításának sokoldalú eszközeivé váltak. Legismertebb és legrégebben alkalmazott felhasználási területük a transzpozon-mutagenézis, amelyre a módszerek fejlődése során számos továbbfejlesztett változatát hozták létre (TnPhoA). Az így generált inszerciók előnye a korábban gyakran használt kémiai mutagenézis módszerekhez képest, hogy nem csupán fenotípusuk detektálható, hanem egyúttal fizikailag is megjelölik a mutáns gént, amivel további genetikai manipulációkra és analízisre adnak lehetőséget.

A bakteriális eredetű IS30 inszerciós szekvencia (Dalrymple és mtsai. 1984) számos előnyös tulajdonsággal rendelkezik, melyek alkalmassá teszik egy hatékony, transzpozon alapú integrációs rendszer kifejlesztésére. Az IS30 elem targetspecificitása jól jellemzett (Olasz és mtsai., 1998) valamint a transzpozáz fehérje doménstruktúrája már részleteiben ismert (Nagy és mtsai., 2004), ami segítséget jelent az inszerciós mutagenézis rendszer hosszabb távú fejlesztésében. Az IS30 transzpozáz igen aktív, 10^{-4} - 10^{-5} transzpozíciós gyakorisággal jellemezhető az elem transzpozíciós intermedier formájának (IS30)₂ jelenlétében (Olasz és mts. 1993, Kiss és Olasz 1999). A transzpozáz fehérje, amely a reakciót katalizálja, mind cisz, mind transz helyzetben működik, ami azt jelenti, hogy a transzpozáz gén különválasztható az aktív (IS30)₂ struktúrától. A transzpozíció során az (IS30)₂ struktúra megoldódik, így a kialakult inszerciós termék stabil.

A fent vázolt tulajdonságok az IS30 inszerciós elemet megfelelő kiindulási rendszerré tették egy olyan inszerciós-mutagenézis módszer kialakítására, amely képes a mutációkat egy adott helyre vagy annak szűk környezetébe irányítani. Ennek érdekében az IS30 transzpozáz célszekvencia specificitását úgy terveztük megváltoztatni, hogy egy teljesen más funkciójú DNS-kötő fehérjét kapcsolunk hozzá. Annak ellenére, hogy az IS30 transzpozáz jól körülhatárolható target-specificitással rendelkezik (Olasz és mtsai., 1998), különböző DNS-kötő fehérjék fúziójával kapott korábbi eredmények (Szabó és mtsai., 2003) arra engednek következtetni, hogy az eredeti target preferencia megváltoztatható egy új DNS kötő domén C-terminális fúziójával. Szabó és munkatársai által a Lambda fág cI represszorának (*E. coli*) és a zebrahal (*Danio rerio*) Gli1 DNS kötő fehérjéjének IS30 transzpozázzal való fúziójával végzett kísérletek azt mutatták, hogy a transzpozáz eredeti target-specificitása

megváltoztatható, és a fúziós transzpozáz a gazdaszervezetek széles tartományában működőképes.

Az IS30 transzpozázra vonatkozó eredmények ismeretében lehetségesnek tűnt a tervezett *Salmonella* vakcina markerezési munkák végrehajtásához egy flagellin génekre tervezett, IS30 alapú irányított mutagenézis rendszer kialakítása. A *Salmonella* Enteritidis flagellin rendszerének PCR-es vizsgálata alapján (2. fejezet) a monofázisos szerovariánsban megtalálható a *fliC* operátor szekvencia, amely közvetlenül az egyetlen flagellin struktúrgénként jelenlévő *fliC* mellett helyezkedik el, így kézenfekvő célpontot kínál az irányított mutagenézishez. Ismert az operátor DNS kötő fehérjéje is, az FljA represszor, amely ráadásul a *S. Enteritidis* törzsekben nem található meg. Így az FljA-val történő irányított mutagenézis az eredeti represszor zavaró hatásától mentes környezetben hajtható végre. A kísérlet végrehajtásához ezért egy olyan fúziós fehérjét hoztunk létre, amely az IS30 transzpozázból és az annak C-terminálisához kapcsolt FljA flagellin represszorból állt.

A fúziós konstrukció elkészítése után első lépésként annak aktivitását vizsgáltuk a kiválasztott *S. Enteritidis* 11 törzsben. Mutagenézist végeztünk mind a vad típusú IS30 transzpozázzal, mind az általunk készített IS30-FljA fúziós konstrukcióval, és azt tapasztaltuk, hogy a két transzpozáz között nincs jelentős eltérés a transzpozíciós gyakoriság tekintetében, a vad típus $8,31 \times 10^{-5}$ - $1,44 \times 10^{-4}$ míg a fúziós transzpozáz $1,62 \times 10^{-4}$ - $1,78 \times 10^{-4}$ közötti értékeket produkált. Ezen adatok megegyeznek a természetes gazda *Escherichia coli*ban mérhető 10^{-4} - 10^{-5} értékekkel, tehát a vad és a fúziós fehérje is megfelelő aktivitást mutat *S. Enteritidis*ben.

Irányított és kontroll *Salmonella* mutánsok gyűjtése céljából három-három párhuzamos mutagenézist végeztünk a SE11 törzsön mind a fúziós, mind a vad típusú transzpozázzal. Az irányított és a kontroll mutagenézisből összesen 600-600 egyedi mutáns (Ap^R , Cm^R) SE11 telepet izoláltunk, úgy, hogy a független kísérletekből egyenként 200-200, mutánst választottunk ki, ezzel is csökkentve a testvér kolóniák kiválasztásának esélyét. Az izolált mutánsok mozgási képességét fenotípusos mozgástesztel megvizsgálva azt tapasztaltuk, hogy az irányított, IS30-FljA fúziós transzpozázzal sikerült összesen négy nem mozgó mutáns törzset előállítanunk ($4/600 \approx 0,7\%$), ezzel szemben a kontroll, vad IS30-cal nyert mutánsok között nem találtunk egyetlen nem mozgó törzset sem ($0/600 = < 0,17\%$). A négy nem mozgó mutáns három független kísérletből származott, tehát nem egy mutáns utódtelepeit izoláltuk. Még szembeötlőbbnek tűnt a két módszer közötti különbség azon mutánsok számát tekintve, amelyek nem veszítették el ugyan teljesen a mozgáskéességüket, de a lágyagaros

tesztel vizsgálva lényegesen gyengébb motilitást mutattak, mint a vad, szülői SE11 törzs. Ezek a gyengén mozgó mutánsok több mint egy nagyságrenddel nagyobb arányban voltak izolálhatóak az irányított kísérletből (309/600 \approx 51,5%), mint a vad transzpozázzal végzett mutagenézisből (13/600 \approx 2,2%). Ezek az adatok azt sugallták, hogy az FljA flagellin represszor segítségével végzett irányított mutagenézis meglehetősen hatékonyan működik, hiszen az így nyert mutánsok több, mint felében sérült a mozgásképeség, emellett több olyan mutánst is sikerült izolálni, melyek irreverzibilisen non motil fenotípust mutattak.

A fúziós transzpozázt egyébként sikeresen kipróbáltuk egy másik *S. Enteritidis* törzsön is, ahol szintén sikerült nem mozgó mutánst előállítanunk. (A kísérlet eredményei nem szerepelnek a dolgozatban.)

Annak érdekében, hogy a mutációk pontos helyét meghatározzuk, szekvenáltuk a donor plazmid (az inszerciós szekvencia) beépülésének környezetét a nem mozgó és számos gyengén mozgó mutáns esetében. A négy nem mozgó mutáns szekvenálási adatait megvizsgálva azt tapasztaltuk, hogy négy esetből háromszor a *fliD* flagelláris génben következett be az inszerció. Elhelyezkedését tekintve a *fliD* közvetlenül a *fliC* operátora mellett található, úgy hogy a két flagellingén (*fliC*, *fliD*) közvetlenül határolja az operátort. Mivel a fúziós transzpozáz tervezett felismerési helye ez az operátor volt, a *fliD*-ben történt inszerció minden bizonnyal az irányított transzpozáz működésének eredménye. A negyedik nem mozgó mutáns szekvencia elemzése azt mutatta, hogy az inszerció ebben az esetben az *yjjY* nevű, ismeretlen funkciójú génben történt. Nem találtunk irodalmi adatot arra vonatkozóan, hogy ez a gén közvetlen szerepet játszana a szalmonellák mozgásában. Felmerült viszont annak a gyanúja, hogy az *yjjY* esetleg a flagelláris gének expressziójának szabályozásában játszhat szerepet és esetleg azok termelődését befolyásolva hat a motilitásra. Ezt a feltételezést látszott támogatni az a tény, hogy az *yjjY* az *arcA* kétkomponensű regulátor mellett helyezkedik el, amely számos más fiziológiai folyamat szabályozása mellett a bakteriális csilló termelődését is serkenti, így a motilitást is befolyásolja. Kétséges volt viszont, hogy csupán a regulátor hatás képes lenne irreverzibilis, stabil nem mozgó fenotípust létrehozni, amelyet a negyedik mutáns esetében megfigyelhettünk. Valószínűbbnek tűnt az a lehetőség, hogy ebben az esetben kettős (vagy többszörös) mutáció történt, amelyek közül mi csak az *yjjY*-t tudtuk detektálni, a nem mozgó fenotípusért pedig a másik, feltáratlan inszerció felelt.

Ezt a feltételezést a részlegesen nem mozgó mutánsok szekvencia eredményei is megerősíteni látszanak. Ebből a fenotípus kategóriából összesen 23 mutánst szekvenálva ugyanis azt tapasztaltuk, hogy az inszerciók közel fele (10/23) ugyanabban a génben, az *yjyY*-ban következett be. Emellett a mutáns gének széles skáláját találtunk a gyengén mozgó kategóriában, amelyek anyagcsere folyamatokban játszanak szerepet (*malT*), iontranszportban vesznek részt (*trkA*) vagy az invázió során lépnek működésbe (*invG*), azonban a mozgásban játszott szerepük legfeljebb csak esetenként és áttételesen feltételezhető. Felmerült tehát a gyanúja annak, hogy a kialakult gyengén mozgó fenotípusért - amely nagy számban csak a fúziós transzpozázal generált mutánsok között volt megfigyelhető - nem a bekövetkezett inszerciók felelősek, hanem a nagy mennyiségben expresszáldó fúziós transzpozáz. A fúziós transzpozáz DNS kötő doménje ugyanis az az FljA represszor, amely eredeti funkciója szerint kötődik a *fliC* operátor régiójához, és gátolja annak kifejeződését. *S. Enteritidis*-ben ráadásul ez az egyetlen flagellin struktúrgén, amely még kifejezettebbé teheti a represszor hatást. Ha tehát jól működik a fúziós transzpozáz DNS kötő doménje, akkor számítani lehet annak represszor hatására is.

A represszor hatást vizsgáló kísérlet eredményeként azt tapasztaltuk, hogy míg a vad IS30 jelenléte esetén nem változik a törzs fenotípusa, addig a fúziós transzpozáz jelentősen képes csökkenteni a mozgásképességet *Salmonella* Enteritidis 11-ben akkor is, ha az inszerciós donor szekvencia nincs jelen a vizsgált baktériumban. Ez a csökkent motilitás az idő előrehaladtával egyre kevésbé kifejezett, mely feltehetően azzal magyarázható, hogy az osztódás során egyes baktériumok flagellintermelése a gátlás alól felszabadul és a tesztelésre használt lágyagart fokozatosan benövik. Mintegy 48 óra elteltével a lágyagarba oltott, fúziós transzpozáz termelő törzs a vad típustól elkülöníthetetlené válik, ellentétben a valódi mozgásképtelen mutánsokkal. Ezáltal az irreverzibilisen nem mozgó, flagellinszintézisben érintett mutánsok az úgynevezett gyengén mozgó – valójában csupán represszorhatást mutató – csoporttól egyértelműen elkülöníthetővé válnak, ahogyan azt a tesztelés során is tapasztaltuk. A jelenlegi rendszer tehát alkalmas a nem mozgó mutánsok azonosítására, bár egy könnyen kiűzhető (például termoszenzitív replikációs origójú) plazmidról termelődő, vagy szigorúbb promóter kontrollja alatt álló transzpozáz nagyban egyszerűsítene a tesztelés folyamatát. Ugyanakkor a flagellin represszió megjelenése a fúziós transzpozáz hatására egyértelmű bizonyítéka annak, hogy a fehérjefúzió sikerült, és az FljA az IS30 transzpozázhoz fuzionáltatva is megőrizte DNS kötő funkcióját.

Továbbra is nyitott maradt viszont az a kérdés, hogy az *yjyY* génben miért következett be ilyen gyakorisággal inszerció. Mivel az *yjyY* ismereteink szerint nem játszik szerepet a flagella felépítésében, szintézisében, így nem valószínű, hogy az FljA represszornak kötőhelye lenne a közvetlen környezetében. Nem valószínű, hogy a magas találati arány az IS30 transzpozáz saját target-specifitásának eredménye lenne, mivel az *yjyY* mutánsokból származó szekvenciák csekély hasonlóságot mutatnak az IS30 forrótalálati helyével (CIG). Szintén ezt támasztják alá azok az eredmények, melyek szerint a *Salmonella* genomban kevés az IS30 számára megfelelő target szekvencia (Casadesus és mtsai., 1999). Más elemek – így például IS10 esetében – is ismert az a jelenség, hogy a transzpozáz nem a konszenzus szekvenciáját ismeri fel hot-spotként (Hartung és mtsai., 2001), mivel a felismerésben más faktorok is szerepet játszhatnak, így például az adott régió transzkripciója, vagy a DNS szerkezete.

Eredményeink szerint az IS30-FljA fúziós transzpozáz alkalmas arra, hogy segítségével nem-mozgó, flagellin termelésben sérült mutánsokat nagyobb gyakorisággal generáljunk mint a vad típusú IS30 transzpozázzal. A mutagenézis eredményeként igen sok gyengén mozgó törzset izoláltunk, melyek azonban minden bizonnyal a fúziós transzpozáz represszor hatásának köszönhetőek. A mutagenézis fő eredményeként viszont négy nem mozgó *Salmonella* Enteritidis 11 mutánst is izoláltunk, melyek közül három igazolhatóan a *fliD* flagelláris génben hordozza az inszerciót. Reményeink szerint ezek a törzsek képezhetik majd az esetleges vakcina jelölt törzsek alapját.

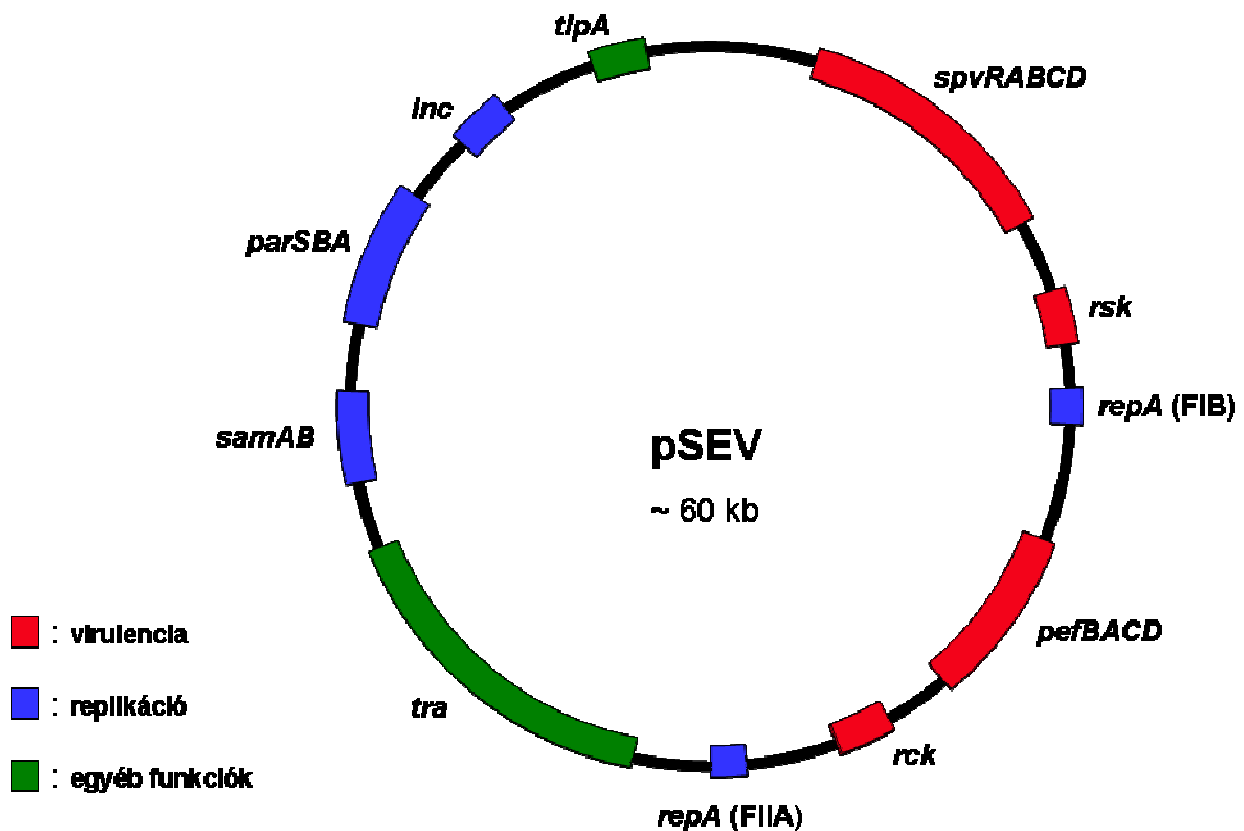
4. Virulencia plazmid űzés a *Salmonella* Enteritidis 11 törzsből

4.1. Bevezetés

4.1.1. A *Salmonella* virulencia plazmid szerepe

Egyes patogén baktériumok gyakran hordoznak nagyméretű plazmidokat, amelyek szerepe a virulencia tulajdonságok hordozásában számos esetben bizonyítást nyert (*Escherichia coli* (Hacker és mtsai., 1997), *Yersinia* (Revell és Miller, 2001), *Salmonella* (Rotger és Casadesus, 1999)). Sok *Salmonella* szerovariáns – így a *S. Enteritidis* – is rendelkezik szerovar specifikus virulencia plazmiddal, melyek mérete általában 50 és 90 kb között változik, egy szerovariánsan belül azonban meghatározott (11. ábra) (Chu és mtsai., 1999). A *Salmonella* virulencia plazmid jelentős szerepet játszik a baktériumnak a parenchimális szervekben valamint a retikuláris-endoteliális rendszerben való fennmaradásában és szaporodásában (Gulig és mtsai., 1993). Az a hozzávetőlegesen 7 kb méretű, konzervatív, virulenciáért felelős régió, amely az *spvRABCD* géneket kódolja minden *Salmonella* virulencia plazmidon jelen van. A plazmid okozta virulens fenotípusért elsősorban az *spv* (*Salmonella* plasmid virulence) operon felelős, amelyben a *spvB* és *spvC* génjei játsszák a legfontosabb szerepet (Matsui és mtsai., 2001). A plazmidon az *spv* régióon kívül további virulenciához kapcsolódó géncsoportok is találhatóak. Ilyen a *pef* (plasmid encoded fimbriae) operon, amely a bélhámsejtekhez való bakteriális adhézióban és feltehetően a gazda specificitás kialakításában játszik szerepet (Bäumler és mtsai., 1996). Jelentős lehet a fertőzési folyamatban az *rck* (resistance to complement killing) gén funkciója is, amely egy külső membrán fehérjét kódol, mely ellenállóbbá teszi a baktériumot a gazda komplement rendszerével szemben (Heffernan és mtsai., 1992).

A virulencia plazmidok kiűzése vagy az általuk kódolt virulencia gének eliminációja általában jelentős csökkenést okoz az adott patogén baktérium törzs megbetegítő képességében, mert bár a plazmid mentes törzsek képesek bejutni a nyirokszervekbe, azonban a szaporodásuk a gazda immunrendszere által korlátozott, így szisztematikus fertőzés nem alakul ki (Rotger és Casadesus, 1999). Ezért a plazmid végleges eliminálása egy esetleges élő, orális *Salmonella* vakcina törzs fejlesztésében is fontos lépést jelenthet.



11. ábra A *S. Enteritidis* virulencia plazmidjának vázlatos genetikai térképe a fontosabb funkcionális régiók feltüntetésével.

4.1.2. Plazmidúzési lehetőségek

Annak érdekében, hogy e natív plazmidok szerepét alaposabban tanulmányozhassuk, illetve az általuk kódolt tulajdonságoktól mentes mutáns baktériumokat előállítsunk, célszerű a virulencia plazmidot kiűzni. Erre számos módszert írtak le. Talán az egyik legismertebb és legelterjedtebb technika az etídium-bromidos kezelés, melyet gyakran kombinálnak hősokkal, magas hőmérsékleten való passzálással (Poppe és Gyles, 1988). Maga az eljárás igen egyszerű és gyors, azonban egyes esetekben kevésbé hatékonynak bizonyult (Pickett és mtsai., 2005).

Az alternatív plazmid eliminációs technikáknak több változata ismert. Talán leggyakrabban a transzpozon közvetítette direkt szelekciós módszerek használatosak, így a Tn5-*sacB* (Hynes és mtsai., 1989) vagy a Tn5-*rpsL* rendszer (Stojiljkovic és mtsai., 1991). Közös alapkonceptiója e módszereknek, hogy transzpozon inszercióval olyan „öngyilkos” tulajdonságokat (szukróz vagy streptomycin érzékenység) közvetítő géneket juttatnak az

eliminálni kívánt plazmidra, amelyek jelenlétében a plazmidot hordozó baktérium elpusztul. Azonban a tapasztalataink szerint (Olasz és mtsai., publikálatlan) e direkt szelekciós rendszerek komponenseinek a transzformálása, fenntartása és megfelelő indukciója igen körülményes, csökkentve a plazmidúzés határfokát. Az érzékenységet közvetítő konstrukció fenntartása, átvitele ugyanis gyakran önmagában is problémát jelent a túlzott érzékenység (például meglehetősen nehéz szukróz szennyeződésektől teljesen mentes táptalajt előállítani) vagy stabilitási nehézségek miatt.

A plazmid-inkompatibilitáson alapuló technikák szintén széles körben elterjedtek. Ezek azon a jelenségen alapulnak, hogy egy második, hasonló inkompatibilitási csoportba tartozó replikon bejuttatása a baktérium sejtbe gyakran vezet a natív plazmid eliminációjához, köszönhetően (i) a két plazmid között a közös replikációs/partíciós elemek használatáért folyó versengésnek (ii) a natív plazmid kópiaszám szabályozás megingásának (Novick, 1987). Habár hatékony és sokszor alkalmazott módszerről van szó (például Tingé és Curtiss, 1990), hátránya, hogy alkalmazásakor a plazmid replikáció és partíció szabályozásáért felelős régiókat azonosítani és klónozni kell.

Célok

Az itt ismertetett munka során – mely a vakcina-jelölt törzs virulencia csökkentését célozta – a nem mozgó *Salmonella* Enteritidis 11 származék SE2102 Cm^R törzsből a nagyméretű virulencia plazmid kiűzését terveztük végrehajtani. Terveink végrehajtásához az eddig leírtaktól eltérő elven működő, hatékony és széles körben használható transzpozon alapú módszert próbáltunk kidolgozni és alkalmazni.

4.2. Anyagok és módszerek

4.2.1. Baktériumtörzsek

S17-1 λ pir: *Escherichia coli* K-12 konjugatív törzs, *pro thi recA λ pir hsdR* ($r^- m^+$) $Tp^R Sm^R$ [Ω RP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7] (Simon és mtsai, 1983)

SE2102: A *Salmonella* Enteritidis 11 E 296 (SE11), 1-es fágtípusú, baromfi eredetű vad törzs nem mozgó származéka, mely inszerciót hordoz a *fliD* génben (*fliD::pFOL1069*), Cm^R .

4.2.2. Táptalajok, antibiotikumok

Bakteriális táptalajként LB tápfolyadékot és agart (Sambrook és mtsai., 1989) használtunk. Elektroporálás után a sejtek regenerálásához SOC médiumot használtunk. Az antibiotikumokat (Sigma) minden esetben az alábbi koncentrációban használtuk: ampicillin (Ap): 150 μ g/ml, kloramfenikol (Cm): 20 μ g/ml, kanamycin (Km): 20 μ g/ml.

4.2.3. Plazmidok

pJKI132: (Farkas és mtsai., 1996) Ap^R , replikációs origója: *colE1*. A pAW380 (Stalder és mtsai., 1989) plazmid származéka, tartalmazza a *lacI^q* gént és az IS30 transzpozáz nyílt leolvasási keretét a *tac* promóter kontrollja alatt.

pJKI336: Ap^R , Km^R , replikációs origója: R6K, RP4 oriT. A pLOFKm (Herrero és mtsai., 1990) plazmid származéka, hordozza az IS10 transzpozáz nyílt leolvasási keretét a *tac* promóter kontrollja mellett. Ezenkívül tartalmazza a mini-Tn10 transzpozont, amelyben a Km^R gén és az összekapcsolt IS30 IR végek az IS10 elem két bal oldali vége által határolva helyezkednek el (Caspers és mtsai., 1984).

4.2.4. Standard mikrobiológiai és molekuláris biológiai eljárások

Az itt nem részletezett molekuláris biológiai módszereket az előző fejezet anyag és módszer részében leírtak szerint (3.2.4.) alkalmaztuk.

Polimeráz lánreakció (PCR)

A plazmid üzési munkák során használt PCR primerek szekvenciái és fontosabb adatai a VIII. táblázatban találhatóak. A PCR paraméterei a 2.2.2. pontban leírtakkal azonosak, kivéve a primer csatolási hőmérsékleteket, amelyeket a VIII. táblázatban a primerszekvenciák mellett tüntettünk fel. A transzpozon inszerció tesztelő PCR-t a 4.2.6. pontban később részletesen ismertetjük.

VIII. táblázat A plazmid üzési munkák során használt PCR primerek fontosabb adatai

Név	Cél gén	Szekvencia (5'-3')	Referencia	T _m
IS10L	<i>IS10 IR</i>	TTAAGATCTA CAAGATGTGT ATCCACCTTA AC		
spvfor	<i>spvR</i>	AGGAGATATT ATGGATTCTT TGATTAA	Jelen munka	55°C
spvrev	<i>spvD</i>	TGTAAGCTAG GAAGTATGTT GGATG		
par1	<i>parBS</i>	GGCGTCAATG GTTGAGATGA CT	Chu és mtsai., 1999	53°C
par2	<i>parBS</i>	GTCCAGTTCA TCCTGAACCA CT		
spvC-1	<i>spvC</i>	CCCATAAATA GGCCTAATCT	Haneda és mtsai., 2001	60°C
spvC-2	<i>spvC</i>	TTACTCTGTC ATCAAACGAT		

Plazmid DNS tisztítás

A plazmidok tisztítása rendszerint a Birnboim-Dolly féle lúgos gyors plazmid izolálás szerint (Birnboim és Dolly, 1979) történt, kivéve a nagyméretű *Salmonella* virulencia plazmid izolálását, amelyet Kado-Liu módszere szerint végeztünk (Kado és Liu, 1981).

4.2.5. Plazmid üzési kísérletek hagyományos (fizikai-kémiai) módszerekkel

Etídium-bromidos (EtBr) és szubletális hőmérsékleten való passzálás: A plazmidot tartalmazó törzset 2 ml különböző koncentrációjú (20, 30, 40 és 50 µg/ml) EtBr-ot tartalmazó LB táplevesbe oltottuk. Az inkubálást 37 °C-on és szubletális hőmérsékleten (41-43 °C) végeztük álló és rázatott tenyészzel egyaránt. A törzset naponta friss, EtBr-os LB levesbe átoltva összesen 40 lépésig passzáltuk. A tenyészetekből minden ötödik passzálsági lépés után mintát vettünk úgy, hogy a tenyészetet LB tápagar felszínén egyes telepre szélesztettük, majd az így nyert izolált egyedi telepeket a plazmid jelenlétére PCR-rel teszteltük.

4.2.6. Transzpozon alapú plazmid úzés

Törzsek:

Donor : *E. coli* S17-1 pJKI 336 Ap^R, Km^R

Recipiens : *Salmonella* Enteritidis 11/2102 Cm^R, *fliD*⁻

Transzpozon mutagenézis:

A mutagenézis során először az IS10 transzpozont (Km^R) hordozó pJKI 336 plazmid (Ap^R) természetes konjugációval átkerül a *Salmonella* sejtbe. Mivel azonban itt defektív replikációs origója miatt nem tud fennmaradni, így a transzpozíció megtörténte után a pJKI336 plazmid elvesz a sejtből (Ap^S). A konjugáció után a transzpozon inszerciót hordozó, plazmidot elvesztett Cm^R, Km^R, Ap^S *Salmonella* Enteritidis 11/2102 sejtekre szelektálunk. A konjugáció részletes menetét lásd a 3.2.6. részben.

Csoportos („poolozott”) PCR-es tesztelés:

Az előzőekben kiválogatott mutánsok közül PCR-es teszteléssel próbáljuk megtalálni azokat, melyek az inszerciót a virulencia plazmidjukon szenvedték el. A tesztelés során az *spv* operont vizsgáltuk két primerpár (IS10L-spvfor és IS10L-spvrev) segítségével, melyek csak akkor adnak reakciót, ha az inszerciós szekvencia (IS10-származék) az *spv* területére ékelődött be. Mivel a tesztelés során a pozitív választ adó mutánsokat kerestük, a vizsgálatot „poolozott” mintákkal, vagyis több törzset egyszerre tesztelve lehetett végezni.

A tesztelés menete:

1. PCR templát preparálásához a tisztított, egyedi mutánsainkat ELISA lemezen, 100 µl Cm tartalmú LB levesbe oltjuk.
2. Inkubáció, 37°C, O/N
3. A mutánsokat nyolcasával (az ELISA lemez oszlopaiként) összegyűjtjük: a 100 µl tenyészeteket egy Eppendorf csőbe mérjük.
4. Centrifugálás 10000 rpm-en, 5 percig (összegyűjtjük a sejteket).
5. Elöntjük a felülúszót, a sejteket 100 µl steril MQ-vízbe visszavesszük.
6. Forralás 20 percig.
7. Fagyasztás 20 percig, -20°C-on.
8. Centrifugálás maximum sebességen, 15 percig.
9. A felülúszót új csőbe tesszük át, ez lesz a PCR templát.

Azokat a nyolcas csoportokat, amelyek a csoportos PCR-rel pozitívnak bizonyultak fölbontottuk, vagyis az abban szereplő mutánsokból egyenként templátot preparáltunk, majd ezekkel a templátokkal a PCR-t megismételtük.

A PCR reakció az alábbi program szerint zajlott: a kezdeti 94°C-os 3 perces denaturáció után 35-szörös ismétlésben:

- 94°C-on 20 másodperc denaturáció,
- 55°C-on 60 másodperc primerkötődés,
- 72°C-on 180 másodperc szintézis.

A 35 ciklus után egy 72 °C-os, 7 perces végső extenziós lépés következett. Majd 4 °C-os tárolás következett felhasználásig.

Szekvencia analízis:

A pozitív mutánsok PCR termékeit az IS10L primerrel szekvenáltattuk, hogy megbizonyosodjunk az inszerció pontos helyéről. A szekvenálásokat a gödöllői Mezőgazdasági Biotechnológiai Központ szolgáltató laboratóriumában végeztettük ABI Prism 301 Genetic Analyser (Applied Biosystems) készülék segítségével.

A szekvenciák összehasonlítását NCBI GenBank adatbanki adatokkal az NCBI BLAST szoftvercsomag blastn (standard nucleotide-nucleotide BLAST) és BLAST 2 Sequences similarity search (Altschul és mtsai. 1990) programjaival végeztük.

Deléciógenerálás IS30 transzpozáz segítségével

Az SE 612 jelű mutánst, mely a fentiek alapján az inszerciót az *spv* operonban, vagyis a virulencia plazmidon hordozta a pJKI132 IS30 transzpozáz termelő plazmiddal transzformáltuk. A transzpozáz termelődést IPTG segítségével indukálva, öt lépésig passzáltuk és az egyes passzálnási lépésekből kloramfenikol tartalmú lemezre szélesztettünk. Az így nyert egyedi telepek közül 100-100 telepet kiválasztva steril fogpiszkálóval átoltottuk kanamycin-kloramfenikol, valamint csak kloramfenikol tartalmú táptalajra. Itt kiválogattuk a kanamycin érzékeny telepeket, (amelyek elszenvedték az IS30 által kiváltott deléció) és vizsgáltuk a rezisztenciájukat elvesztett mutánsok arányát az egyes passzálnási lépésekben. A kiválasztott érzékeny telepeket a virulencia plazmid jelenlétére a plazmid specifikus *parBS* és *spvC* primerekkel tovább teszteltük.

4.3. Eredmények

4.3.1. Előzetes eredmények

Az előző fejezetben tárgyalt irányított transzpozon mutagenézis rendszerrel sikerült négy nem mozgó *Salmonella* Enteritidis 11 törzset létrehozunk. Ezek közül háromnak (SE11/2102, 2107, 2520) az inszerció pontos helye is ismert volt, így ezekkel dolgoztunk tovább. Első lépésként szükségesnek láttuk a mutánsokban még jelenlévő, fúziós transzpozáz termelő pFOL1111 plazmid kiűzését. Erre több okból is szükség volt: (i) a transzpozáz jelenlétében fennállt a veszélye az esetleges további genetikai átrendeződéseknek a vakcina jelölt törzsekben, (ii) a tervezett genetikai beavatkozásokhoz szükségünk volt az ampicillin markerre (amelyet a pFOL1111, a flagellin bénítás során használt fúziós transzpozáz termelő plazmid is hordoz), (iii) a soron következő állatkísérletre való tekintettel az antibiotikum rezisztens plazmid jelenlétét nem tartottuk kívánatosnak. A plazmid űzését a hagyományos, etídium-bromidos passzálási módszerrel hajtottuk végre. Öt passzálási lépés után a megvizsgált telepek mindegyike ampicillinre érzékeny volt mindhárom mutáns esetében (100, vagy több megvizsgált telep között nem találtunk rezisztens kolóniát) – vagyis a transzpozáz termelő plazmid nagy hatékonysággal eliminálódott.

A következő lépésként naposcsibe modellen hasonlítottuk össze a nem mozgó mutánsok és a szülői törzs virulencia tulajdonságait (részletesen lásd: 5. fejezet). Ezen előzetes vizsgálatok alapján a három törzs között naposcsibe szerv-inváziós tulajdonságaik tekintetében nem mutatkozott lényeges eltérés, míg a legmagasabb vakbél titert a SE11/2102 törzs érte el, így a további kísérletek céljából ezt a mutánst választottuk ki.

4.3.2. Virulencia plazmid űzési eredmények hagyományos módszerekkel

A *Salmonella* virulencia plazmid kiűzését a nem mozgó SE11/2102 törzsből elsőként a hagyományos, etídium-bromidos táplevesben való passzálással, magas, szubletális hőmérsékleten való passzálással, valamint ezek kombinációjával próbáltuk elérni.

A plazmidot hordozó törzset négy különböző koncentrációjú (20, 30, 40 és 50 µg/ml) EtBr-ot tartalmazó táplevesbe oltottuk. Az inkubálást 37 °C-on és szubletális hőmérsékleten (41-43 °C) végeztük álló és rázatott tenyésztéssel egyaránt. A törzset naponta friss, rázatott EtBr-os

levesbe átoltva passzáltuk, ezt a kísérletet összesen 40 lépésig folytattuk, így próbálva minél magasabb generációs számot elérni. Ezzel párhuzamosan stacioner fázisú levestenyészetben is passzáltuk a baktériumot, 2-3 naponta oltva át a törzset. A tenyészetekből minden ötödik passzálnál lépés után vettünk mintát s az így nyert egyedi telepeket teszteltük a plazmid jelenlétére.

A kiválasztott telepekben a plazmid jelenlétét, a *Salmonella* virulencia plazmidokon mindig megtalálható *spvC* virulencia génre specifikus primer pár segítségével, PCR-rel vizsgáltuk (VIII. táblázat). A kísérletek során összesen 920 egyedi telepet vizsgáltunk meg PCR-rel a virulencia plazmid jelenlétére, és azt tapasztaltuk, hogy ezek mindegyike hordozta azt (12. ábra). A különböző passzálnál lépésekből izolált, plazmid jelenlétére megvizsgált telepek számát a IX. táblázat mutatja.

IX. táblázat A hagyományos EtBr módszerekkel végzett virulencia plazmid üzési kísérletek eredményei a *Salmonella* Enteritidis 11/2102 törzsön. (A plazmid jelenlétét az *spvC* génre specifikus PCR-rel végeztük.)

Passzázsok száma	A tesztelt telepek száma	Plazmid mentes	Eliminálási gyakoriság
1-10	470	-	<0,002
11-20	180	-	<0,006
21-40	270	-	<0,004
Össz.: 1-40	920	-	<0,001

4.3.3. A *Salmonella* virulencia plazmid transzpozon alapú eliminálása

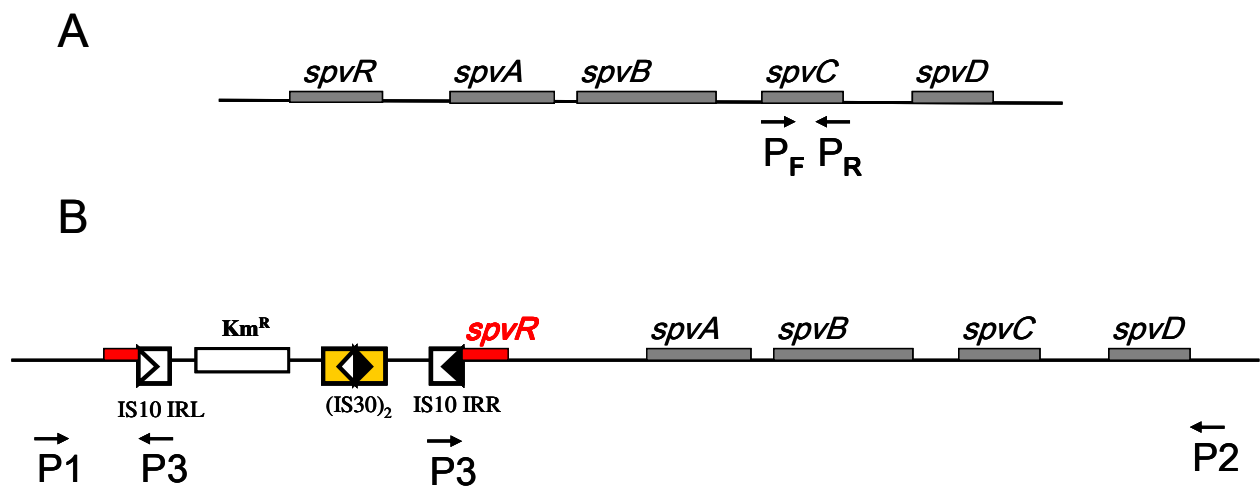
Miután a hagyományos úton végrehajtott plazmid üzési kísérletek kudarcot vallottak, kénytelenek voltunk egy transzpozon alapú plazmid eliminációs módszert kidolgozni. A módszer azon a felismerésen alapul, hogy a transzpozíció folyamata gyakran vezet az érintett cirkuláris DNS linearizációjához majd degradációjához (Szabó és mtsai., 1999, Haniford és mtsai., 2002).

A rendszer két – egymást követően alkalmazandó - komponensből áll. Az első a pJKI336 plazmid, amely egy mini *Tn10* transzpozon konstrukciót hordoz, és e mellett az IS10 transzpozáztt kódolja. A *Tn10* transzpozon egység az IS10 IR végek által határolva a kanamycin rezisztencia gént és az összekapcsolódott IS30 IR végeket hordozza. A második

komponens az ampicillin rezisztens pJKI132 plazmid, amely az IS30 transzpozázt kódolja (14. ábra).

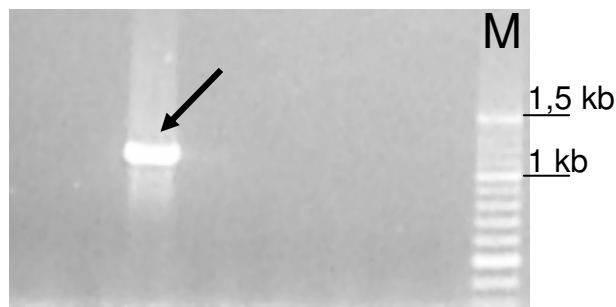
Első lépésként a *Tn10* transzpozon segítségével a pJKI336 plazmid transzfere után random mutagenézist hajtottunk végre. Ennek során a konjugációs donor az *E. coli* S17-1 pJKI336 Ap^R, Km^R törzs volt, amely a SE2102 Cm^R recipiens törzsbe juttatta át a *Tn10* transzpozon konstrukciót hordozó pJKI336 plazmidot. A konjugáció után az inszerciót szenvedett, kanamycin (és kloramfenikol) rezisztens SE2102 baktériumokra szelektáltunk. A mutagenézis során a transzpozíciós gyakoriság 1×10^{-5} és 3×10^{-5} értékek között változott recipiens baktériumra vonatkoztatva. A *S. Enteritidis* 11/2102 törzsön közel 3000 egyedi kanamycin rezisztens inszerciós mutánst állítottunk elő. Ebből a mutáns gyűjteményből kellett kiválasztanunk azokat a mutánsokat, amelyek a *Tn10* inszerciót a virulencia plazmidon szenvedték el. A vizsgálat végrehajtására egy olyan PCR-es szűrőrendszert terveztünk, amely segítségével képesek voltunk az inszerciókat detektálni a virulencia plazmid egy viszonylag nagy, 6 kb-os régiójában, az *spv* operonon (*spvRABCD*, Chu és mtsai., 1999). A tesztelendő szakasz méretét úgy választottuk meg, hogy az elég nagy „felületet” nyújtson a véletlenszerű mutagenézishez, ugyanakkor az is fontos szempont volt, hogy lehetőség szerint egy, vagy néhány egyszerű PCR reakcióval lehessen dolgozni. (5 Mb-os *Salmonella* genommal számolva, feltételezve, hogy a virulencia plazmid csak egy kópiában van jelen, hozzávetőlegesen 800 mutáns közül egyben számíthattunk találatra egy 6 kb-os plazmid szakasz tesztelése esetén.)

A tesztelő PCR rendszer primereit úgy terveztük meg, hogy az operon szélein elhelyezkedő *spvR* és *spvD* génekből az operon közepe felé író két primer (*spvfor*, *spvrev*) és az *IS10* végre specifikus *IS10L* primerek kombinációja csak akkor adjon pozitív reakciót, ha ott jelen van a *Tn10* inszerció (12. ábra). Mivel a *Taq* polimeráz optimális esetben sem képes 6 kb hosszú szakasz átírására, ezért az összeállított PCR csak akkor ad jelet, ha inszerció történt az *spv* régióban. Így ezzel a módszerrel a mutánsok „poolozott” tesztelése is lehetségessé vált.



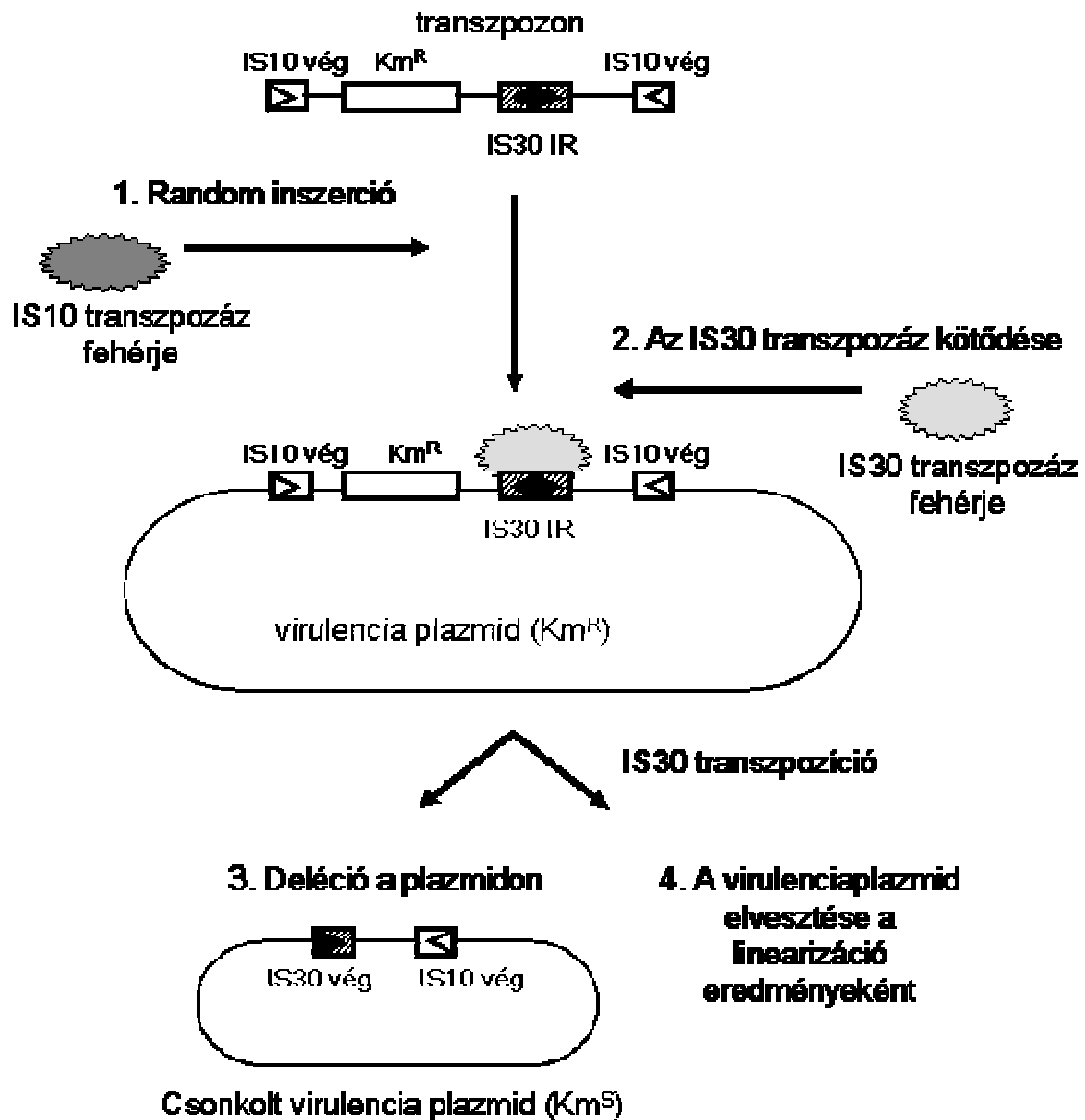
12. ábra Az ábra A része az intakt *spv* operont mutatja, a P_F és P_R primerek a plazmid jelenlétének tesztelésére szolgáltak (P_F : *spvCfor*, P_R : *spvCrev*) A B rész az inszerció tesztelő primerek elhelyezkedését mutatja egy lehetséges szituációban, amikor a mutáció az *spvR* génben következik be ($P1$: *spvfor*, $P2$: *spvrev*, $P3$: *IS10L*).

A fent ismertetett PCR rendszer segítségével, az előállított 2850 mutáns 8-as csoportokban történő szűrése után két pozitív „poolt” sikerült azonosítani, amelyek felbontása során két egyedi PCR pozitív mutánst találtunk. Annak érdekében, hogy az inszerciók pontos helyét meghatározzuk, a PCR termékeket szekvenáltattuk az *IS10L* primerrel, így azonosítottuk a beékelődött transzpozonok „flanking” régióját. A szekvenálás eredményeként bebizonyosodott, hogy az inszerciók a virulencia plazmidon, az *spv* régió szabályozó génjében, az *spvR*-ben, valamint az *spvC* virulencia génben következtek be. A további kísérletekhez a *S. Enteritidis* 11/2102/612 Cm^R , Km^R (A továbbiakban: SE 612 Km^R) *spvR* mutánst választottuk ki (13. ábra).



13. ábra Az SE 612 Km^R törzs azonosítása, mely az inszerciót a plazmidon kódolt *spvR* génben hordozza (*spvfor-IS10L* primerpár használatával). Mólsúlymarker: O'Range Ruler™ 100 bp DNA Ladder (Fermentas).

Miután birtokunkban volt a SE 612 Km^R törzs, mely a *Tn10* transzpozon konstrukciót a virulencia plazmidján stabilan beékelődve hordozta, megpróbáltuk végrehajtani a virulencia plazmid teljes eliminációját az *IS30* transzpozáz segítségével. A SE 612 Km^R törzsbe bejuttattuk a transzpozáz termelő pJKI132 plazmidot, majd a virulencia plazmidon bekövetkező genetikai átrendeződéseket a törzs kanamycin rezisztenciájának eltűnésével terveztük nyomon követni. A SE 612 Km^R törzs ugyanis a - kanamycin rezisztencia kazetta mellett elhelyezkedő – összekapcsolódott, reaktív *IS30* IR végeken keresztül lezajló átrendeződések miatt (Olasz és mtsai., 1993) nagy gyakorisággal elveszítheti antibiotikum rezisztenciáját, ezzel megfelelő markert szolgáltatva a deléciót elszenvedett (vagy a teljes virulencia plazmidot elvesztett) változatok kiválasztásához (14. ábra).



14. ábra A transzpozon alapú plazmid elimináció folyamat ábrája.

A Tn10 alapú transzporon konstrukció (amely a Km rezisztenciát és az összekapcsolódott IS30 IR végeket hordozza) egy defektív replikációjú konjugatív plazmidon helyezkedik el (pJKI336, az ábrán nincs jelölve). A plazmid nem képes replikálódni a *Salmonella* sejtekben, így a Km^R recipiensek megjelenése azt mutatja, hogy ott Tn10 inszerció történt (1. lépés: random inszerció). Amint sikerült az inszerciót a virulencia plazmidon hordozó mutánszt találnunk, transzformáltuk az IS30 transzpozáz termelő plazmiddal (pJKI132, az ábrán nincs jelölve). Az IS30 transzpozáz fehérje felismerve az összekapcsolódott IS30 IR végeket azokhoz kötődik (2. lépés). Ezáltal deléciók képződését indukálhatja (3. lépés), mely egyes esetekben a plazmid teljes elvesztéséhez vezet (4. lépés).

Az IS30 transzpozáz indukciója mellett a törzset levestenyészetben passzálva követtük a kanamycin érzékeny kolóniák arányának változását két párhuzamos kísérletben. Azt tapasztaltuk, hogy már az első passzálási lépést követően (hozzávetőlegesen 12 generáció elteltével) 79 és 26% volt a kanamycin érzékeny mutánsok aránya, míg az ötödik passzázs végére (kb. 60 generáció múlva) ez az arány elérte a 89 és 77%-ot (X. táblázat).

X. A, B táblázat A kanamycin érzékenység alakulása a *S. Enteritidis* 612 Km^R törzsben az IS30 transzpozáz indukcióját követően. A két táblázat két független passzálás eredményeit mutatja.

A)

Passzálási lépés	Km ^S arány (n)	Km ^R arány (n)	Vizsgált telepek száma
1.	79,5% (78)	20,5% (20)	98
2.	74,7% (68)	25,3% (23)	91
3.	84,6% (77)	15,4% (14)	91
4.	90,3% (84)	9,7% (9)	93
5.	89,2% (83)	10,8% (10)	93

B)

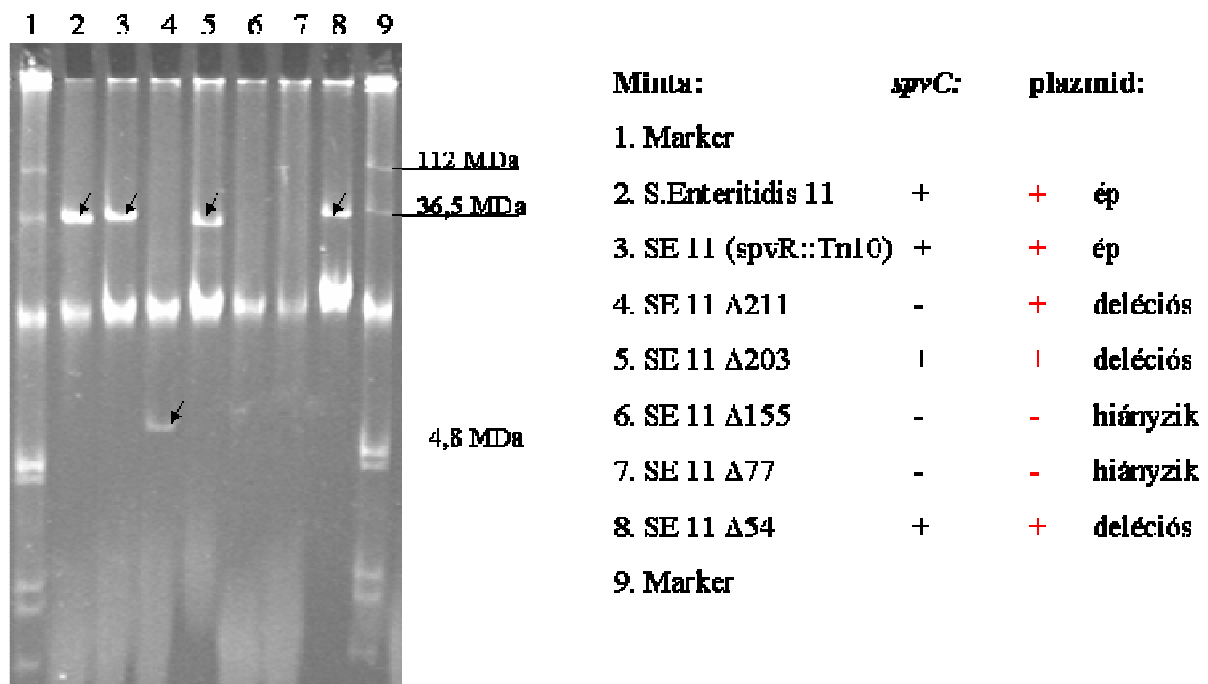
Passzálási lépés	Km ^S arány (n)	Km ^R arány (n)	Vizsgált telepek száma
1.	26,5% (26)	73,5% (72)	98
2.	46,2% (43)	53,8% (50)	93
3.	51,1% (48)	48,9% (46)	94
4.	86,0% (80)	14,0% (13)	93
5.	77,2% (71)	22,8% (21)	92

A kanamycin érzékeny törzsek összességét és több mint 50 kanamycin rezisztens törzset tovább vizsgáltuk a *parBS* és az *spvC* virulencia plazmid specifikus primerpárokkal (VIII. táblázat) annak érdekében, hogy a deléció mértékéről és gyakoriságáról pontosabb képet kapjunk. A PCR-es vizsgálat eredményeként azt találtuk, hogy a kanamycin érzékeny törzsek esetén (ahol tudható, hogy biztosan történt genetikai átrendeződés) a tesztelt génszakaszok az esetek döntő többségében (98%) hiányoztak, és csak elenyésző számban (2%) lehetett *spvC* vagy *parBS* pozitív törzset találni. A várakozásoknak megfelelően fordított arányok voltak megfigyelhetők a kanamycin rezisztens telepek esetén. Ott ugyanis a tesztelt törzsek 93%-a hordozta az *spvC* gént (és csak 7%-ból hiányzott). Ugyanakkor *parBS* negatív, kanamycin rezisztens törzset egyáltalán nem izoláltunk (XI. táblázat).

XI. táblázat A virulencia plazmid deléciók megoszlása a Km^S és Km^R SE 612 utód kolóniák esetén az IS30 transzpozáz működését követően. (Az adatok PCR-es tesztelés eredményei.)

Tesztelt szakasz	Km ^S kolóniák esetében		Km ^R kolóniák esetében	
	Jelen van	Hiányzik	Jelen van	Hiányzik
<i>spvC</i>	2%	98%	93%	7%
<i>parBS</i>	2%	98%	100%	-

A PCR-rel tesztelt, kanamycin szenzitív, deléciók SE 612 származékok egy részén plazmid profil vizsgálatot is végeztünk ellenőrizendő, hogy törzseink a virulencia plazmidjukat valóban elvesztették. Tapasztalataink szerint azok a törzsek, melyekből hiányzott az *spvC* gén, megváltozott plazmid profilt is mutattak (15. ábra). Az esetek többségében a teljes virulencia plazmid eltűnt (15. ábra, 6., 7. mintája), vagy ha nem is eliminálódott teljesen, mérete akkor is szemmel láthatóan csökkent a deléció következményeként (15. ábra, 4. minta). Olyan kanamycin szenzitív (tehát biztosan deléciók) törzset is izoláltunk, amely olyan kis kiterjedésű deléciót szenvedett csak, hogy a plazmid profil alapján sem látszott eltérés az eredeti méretű virulencia plazmidhoz képest (15. ábra, 5. minta), és a PCR eredmények alapján az *spvC*-t is hordozta.



15. ábra Különböző deléció mutánsok és a szülői *S. Enteritidis* 11 plazmid profilja. Az ép virulencia plazmid a 36,5 MDa magasságában látható (SE11, 2. minta). A gél közepén, minden mintában megtalálható erős csík a kromozómális DNS maradványa.

4.4. Megbeszélés

Egyes szerovarokhoz tartozó *Salmonella* törzseket általában jellemzi egy olyan nagyméretű virulencia plazmid, mely a szisztémás fertőzés kialakításában lényeges szerepet játszhat. A *Salmonella* virulencia plazmidok mérete széles határok (50-90 kb) között változhat; a *S. Enteritidis* esetében 60 kb méretűek. A plazmidok alacsony kópiaszámban vannak jelen a sejtekben, replikációjuk és utódsejtekbe való továbbjutásuk (partíciójuk) szigorúan szabályozott. A plazmidon elhelyezkedő legfontosabb virulencia determináns a konzervált *spv* régió, amely minden – ilyen plazmiddal bíró - szerovariáns virulencia plazmidján jelen van, és legfontosabb szerepe, hogy a baktériumnak a gazda nyirokszerveiben való szaporodását biztosítsa.

Több forrásból ismert, hogy a virulencia plazmidok hiánya a szisztematikus fertőzés kialakulását a melegvérű állatok szervezetében jelentősen megnehezíti. Bízva abban, hogy ez a virulencia csökkenés az általunk előállított, flagellinhiányos SE2102 (*Salmonella* Enteritidis 11 származék) vakcina jelöltben is bekövetkezik, elhatároztuk a virulencia plazmid kiűzését a törzsből.

Plazmidűzési eljárásaként először a hagyományos etídium-bromidos táplevesben való passzálást alkalmaztuk, amelyet egy párhuzamos kísérlet keretében magas hőmérsékleten való tenyésztéssel egészítettünk ki. Az etídium-bromid, mint interkaláló ágens gyenge mutagénként és általános stressz faktorként DNS replikációs nehézségeket okozhat a baktériumnak. Ezzel azoknak a sejteknek a szelekcióját eredményezheti, melyek elveszítik az *in vitro* szaporodási körülmények között felesleges virulencia plazmidot, így téve szert rövid távú szaporodási előnyre. Újabb stressz faktorként reményeink szerint ehhez járult hozzá a magas hőmérséklet, és a szokásosnál hosszabb/rövidebb stacioner fázis.

A szóbanforgó plazmid jelenlétének nyomonkövetésére az egyik legfontosabb plazmidon kódolt virulencia gént, az *spvC*-t használtuk, s jelenlétét PCR-rel teszteltük. Azért ezt a szakaszt választottuk, mert úgy gondoltuk, hogy ettől a virulencia géntől mindenképpen meg kell szabadulni ha virulencia csökkenést akarunk elérni. Így lehet ugyan, hogy esetleg elszalasztunk egyéb deléciós virulencia plazmid származékokat (lásd 15. ábra, 5. minta), de ha azok hordozzák az *spvC* gént, akkor számunkra nem annyira jelentősek, hogy megérné komplikáltabb módszerrel is keresni azokat.

Mindezek ellenére sajnos a klasszikus módszerekkel való plazmid üzési próbálkozásaink nem jártak sikerrel. Közel 1000, etídium-bromidos és hő kezelésen átesett izolátum tesztelése után sem találtunk plazmid hiányos törzset. A tesztelt izolátumok a passzálási folyamat különböző lépéseiből, különböző etídium-bromid koncentrációjú és hőmérsékleten inkubált táplevesből származtak. A legtovább passzált telep 40 átoltási lépésen – mintegy 480 generáción – keresztül volt kezelve, azonban így is megőrizte plazmidját. Tapasztalataink szerint az etídium-bromidos módszerrel való passzálassal a virulencia plazmid eliminálási gyakorisága a *S. Enteritidis* 2102 törzsből kisebb mint 0,001. Ez a meglehetősen alacsony érték valószínűleg annak köszönhető, hogy a plazmid erős replikációs és partíciós szabályozás alatt áll, mely gondoskodik arról, hogy az osztódás során minden leánysejtbe jusson virulencia plazmid. Ez a szabályozás erősen lecsökkenti annak az esélyét, hogy az olyan sztochasztikus hatások, mint az etídium-bromidos kezelés eliminálják a plazmidot, és így egyes leszármazási vonalakból plazmidmentes változatok alakuljanak ki. Eredményeink e tekintetben megerősítik Pickett és munkatársai eredményeit, akik különböző *Chlamydia* fajok esetében különböző hagyományos elimináló szerek (többek között az etídium-bromid) plazmid kópiaszámra gyakorolt hatását vizsgálták, és meglepő módon azt tapasztalták, hogy a *Chlamydia* plazmidok kópiaszáma megnövekedett (Pickett és mtsai., 2005). Ennek az ellentmondásos jelenségnek a magyarázatát a szerzők abban látják, hogy a sejtélősködő *Chlamydia* a (közvetlenül a sejtet ért) stressz hatására beinduló SOS válasz részeként növeli a plazmid kópiaszámot. Hasonló jelenség nem zárható ki szalmonellákban sem, azonban a legtöbb esetben (így *Streptomyces*ekben (Crameri és mtsai., 1986), *Oenococcus oeni*ben (Mesas és mtsai., 2004) és sok *Salmonella* szerovariánsban (Poppe és Gyles 1988) a kémiai plazmid eliminálási kísérletek sikerrel jártak.

Miután a hagyományos, fizikai-kémiai módszerekkel való plazmid üzés nem járt sikerrel, és a bevezetőben ismertetett módszerek alkalmazását is nehézkesnek véltük, úgy döntöttünk, hogy a virulencia plazmid kiűzésére transzpozíciós folyamatokon alapuló módszert dolgozunk ki. A munka első fázisában egyszerű transzpozon mutagenézist hajtottunk végre a SE2102 törzsön, amelynek az volt a célja, hogy a baktérium virulencia plazmidját a Tn10 transzpozon kódolta kanamycin rezisztencia génnel megjelöljük. A transzpozon szintén hordozta azt az összekapcsolódott IS30 IR végekből álló DNS szakaszt, mely csak IS30 transzpozáz jelenlétében aktív, s amely a munka második részében a plazmid eliminációjához vezető genetikai átrendeződések kiindulópontja volt.

Az új plazmidűzési módszer a *Salmonella* Enteritidis 2102 törzs esetében hatékonyan működött. A kezelés hatására a vizsgált mutánsok több mint 50%-a virulencia plazmidjét elvesztette. Ennél is magasabb lett a kanamycin szenzitív mutánsok aránya, melyek nem feltétlenül veszítették el a teljes plazmidjukat, azonban legalább akkora deléció lejátszódott plazmidjukon, amely az ott elhelyezkedő kanamycin rezisztencia gént érintette. Eljárásunk hatékonyságát mutatja, hogy mindkét elvégzett párhuzamos kísérlet esetében a deléciós mutánsok aránya több mint 70% volt (X. táblázat).

A módszer további előnye, hogy nem csak a teljes plazmid kiűzésére alkalmas, hanem – amint azt a PCR és plazmid profil eredmények egybehangzóan mutatják - segítségével részleges deléciók is létrehozhatók. Ezek a deléciós mutánsok főként ismeretlen plazmidok esetében játszhatnak fontos szerepet, hiszen a deléciós származékok analízisével a plazmid funkciója is meghatározható. A delécióval nyert csonkolt plazmidoknak ugyancsak fontos szerepe lehet, ha az eredeti, natív plazmid visszatérését kívánjuk megakadályozni. Ilyen esetben ugyanis a teljes elimináció helyett egy, a kívánt génektől mentes, de replikációra még képes csonka plazmid kialakítása és fenntartása lehet a megoldás. Ez a szempont fontos lehet a vakcina jelölt törzs fejlesztése során is, ha a virulencia plazmid képes a visszatérésre a plazmid mentes törzsbe. A vakcina jelölt törzsben a virulencia plazmid eliminációja (vagy egy kisebb méretű deléciós plazmid származék) egy újabb megkülönböztető jegyet jelent a vad törzshöz képest.

A módszernek fontos tulajdonsága, hogy egyszerű, és olyan plazmidok eliminációja esetében is alkalmazható, amelyek nem hordoznak fenotípusos markert, mivel PCR segítségével viszonylag gyorsan azonosítható a célplazmidon bekövetkezett *Tn10* inszerció. Olyan esetben pedig, amikor ismeretlen szekvenciájú, de meghatározott fenotípussal rendelkező plazmidot szeretnénk kiűzni, szintén használható. Ilyenkor a fenotípus eltűnése jelzi a *Tn10* inszerciót.

A leírt transzpozon alapú plazmidűzési technika általánosan használható más fajok esetében is, ha a szükséges komponensek (plazmidok, transzpozázok, antibiotikum markerek) működnek az adott baktériumban. Saját (jelen dolgozatban nem ismertett) adataink szerint enterotoxikus *Escherichia coli*-ban szintén jól működik a módszer (Imre és mtsai., 2006).

A transzpozonok régóta alkalmazott eszközök a plazmid űzési eljárások során. Eleinte a hagyományos módszerek esetében használták a kiűzendő plazmid jelölésére, nyomon követésére például a *Tn1*, *Tn5*, *Tn10* elemeket (Pope és Gyles 1988). Majd a direkt szelekciós módszerek esetében gyakran az „öngyilkos” gén plazmidra juttatását oldották

meg segítségükkel: *Tn5-sacB* (Hynes és mtsai., 1989), *Tn5-rpsL* (Stojiljkovic és mtsai., 1991).

Az általunk kidolgozott plazmid üzési technika legfontosabb újdonsága, hogy az eljárás során a mobilis genetikai elemeknek nem csak azt a tulajdonságát használja ki, hogy a cél plazmidra való áthelyeződésükkel fizikailag megjelölik az eliminálandó replikont, hanem az elem genetikai átrendeződéseket indukáló hajlamát is kiaknázza. Az IS30 transzpozáz által katalizált reakciók közül a legismertebb az inszerció, de képes deléció, inverzió és fúzió végrehajtására is (Olasz és mtsai., 1993). A fent leírt módszer azon a jelenségen alapul, hogy az IS30 transzpozáz nagy gyakorisággal hajt végre deléciókat az összekapcsolódott IR végek jelenlétében. Amennyiben az (IS30 transzpozáz jelenlétében igen aktív) IR végek a kiűzni kívánt plazmidon helyezkednek el, úgy a lejátszódó genetikai átrendeződések gyakran vezetnek a replikon eliminációjához. A replikon eltűnésének oka lehet, hogy a transzpozáz által katalizált deléció a plazmid replikációs origóját, vagy más, a plazmid fennmaradásához nélkülözhetetlen DNS szakaszt érint, de a fent említett átrendeződések jelentős deléció nélkül is vezethetnek az érintett cirkuláris DNS linearizációjához majd degradációjához (Szabó és mtsai., 1999). A módszer ezen sajátossága miatt mintegy „melléktermékként” nagy számban keletkeznek kisebb-nagyobb deléciókat szenvedett csonkolt plazmid változatok, amelyek a plazmid által kódolt tulajdonságok deléciós térképezésére is alkalmasak lehetnek. Ilyeneket magunk is mutattunk ki (15. ábra).

Mіндеzen tulajdonságai alapján a fenti transzpozon alapú rendszer nem pusztán hatékony plazmidüzési eszköz, de segítséget nyújthat ismeretlen funkciójú plazmidok megismerésében is.

5. A vakcinajelölt törzsek ártalmatlansága és a korai védekező képességet stimuláló hatása

5.1. Bevezetés

Mint az irodalmi áttekintésben (1.4.) vázoltuk, a vakcinázás a gazdasági haszonállatok (elsősorban a baromfi) *Salmonella* elleni védelmének egyik gyakran alkalmazott eszköze.

Nyilvánvaló, hogy a megfelelő védőhatás érdekében egy hatékony *Salmonella* vakcinának a sejt közvetítette és a humorális immunválaszt egyaránt indukálnia kell. Ennek megfelelően az élő, orális vakcinák rendszerint sokkal hatékonyabb védelmet biztosítanak a *Salmonella* fertőzések ellen, mint az elölt vakcinák, ugyanis míg az előbbiek stimulálják mind a sejt, mind a humorális immun folyamatokat, addig az inaktivált vakcinák főként a keringő ellenanyag termelést serkentik (Van Immerseel és mtsai., 2005). Ezen az alapvető problémán túl az elölt (parenterálisan alkalmazandó) *Salmonella* vakcinák számos hátrányos tulajdonságára hívták fel a figyelmet. Az inaktivált vakcinák esetében megfigyelhető gyenge védőhatás magyarázata lehet a vakcináknak szervezetből való gyors kiürülése és a védelemért felelős antigének vakcina gyártás során történő lebomlása (Barrow, 1991). A vakcina törzs ugyanis indukció hiányában gyakran nem expresszál egyes fontos immunogén antigéneket (Barrow és Wallis, 2000). Továbbá, a parenterálisan alkalmazott elölt vakcinák nem képesek kiváltani a szekretoros IgA termelést, amely igen fontos szerepet játszik a mucosa kórokozókkal szembeni védelmében (Barrow és Wallis 2000). Feltehetően a fent részletezett okok miatt, az elölt vakcinákkal végzett kísérletek során eltérő hatékonyságot tapasztaltak, mely nagyban függött a vakcina típusától (Timms és mtsai., 1990, Gast és mtsai., 1992, Woodward és mtsai., 2002). Ezzel szemben az élő vakcinák sokkal nagyobb hatékonyságot mutattak a bél kolonizáció és a szervinvázió gátlásának terén. Hatékonyságuk valószínűleg elsősorban a gazda szervezetébe való limitált bejutásnak és az így aktivált lokális és általános sejt immunitásnak köszönhető (Nagaraja és Rajashekara 1999, Babu és mtsai., 2003).

Az élő, attenuált orális vakcina védő hatása egy virulens törzs kolonizációjával szemben több *S. Enteritidis* és *S. Typhimurium* vakcina törzs esetében jól dokumentált (Curtiss and Kelly, 1987, Barrow és mtsai., 1990, Cooper és mtsai., 1990, 1992, 1994a,b, Hassan és Curtiss, 1994, 1996, 1997). Ezekben az esetekben az élő vakcinával szemben támasztott

követelmények között a hatékony védő képességen túl mindig szerepel a gazdával szembeni ártalmatlanság és a gyors kiürülés. Ennek megfelelően az esetleges vakcina jelölt törzsünk *in vitro* és *in vivo* vizsgálata során mi is ezeket a szempontokat tartottuk elsősorban szem előtt.

5.2. Anyagok és módszerek

5.2.1. Baktériumtörzsek

SE11: *Salmonella* Enteritidis 11 E 296, 1-es fág típusú, baromfi eredetű vad törzs

SE2102: a *Salmonella* Enteritidis 11 nem mozgó változata (SE11 *fliD*::*pFOL1069*, *Cm^R*)

SE2107: a *Salmonella* Enteritidis 11 nem mozgó változata (SE11 *fliD*::*pFOL1069*, *Cm^R*)

SE2520: a *Salmonella* Enteritidis 11 nem mozgó változata (SE11 *fliD*::*pFOL1069*, *Cm^R*)

SE Δ 77: Az SE2102 virulencia plazmid mentes változata

SE Δ 155: Az SE2102 virulencia plazmid mentes változata

SE Δ 211: Az SE2102 virulencia plazmid deléciós (*Δ spvRABCD*) változata

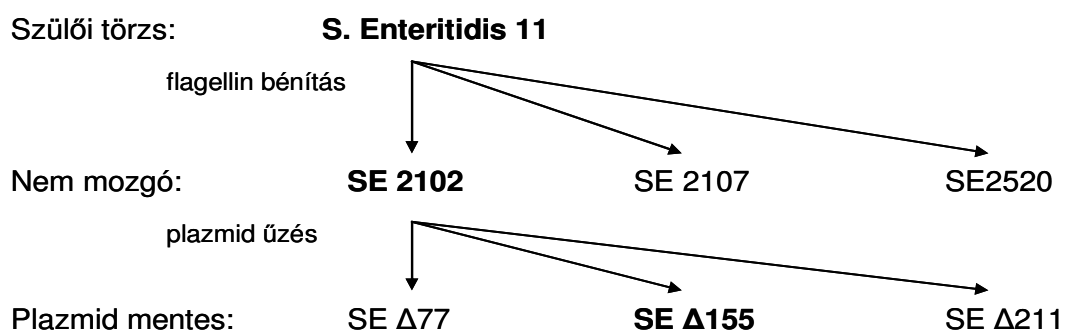
SE 10091: *Salmonella* Enteritidis 10091 (Imre és mtsai., 2005)

SE 147: *Salmonella* Enteritidis 147 törzs (Methner és mtsai., 1995)

ST F98: *Salmonella* Typhimurium F98 törzs (Barrow és mtsai., 1987)

ST Zoosaloral: *Salmonella* Typhimurium Zoosaloral-H, kommerciális élő vakcina törzs

E. coli C600: *Escherichia coli* K-12 laboratóriumi törzs, negatív kontroll (Sambrook és mtsai., 1989)



16. ábra: A *S. Enteritidis* 11 jelű törzs és különböző származékainak viszonya. A SE2102, SE2107 és SE2520 jelű törzsek irányított transzpozon mutagenézissel (3.3. fejezet) lettek előállítva a SE11 törzsből, míg a SE Δ 77, SE Δ 155 és SE Δ 211 törzsek a SE2102 plazmidűzött változatai (4.3. fejezet).

5.2.2. Táptalajok, antibiotikumok

Standard bakteriális táptalajként LB (Sambrook és mtsai., 1989) és TSB tápfolyadékot (17 g pepton, 3 g szójakivonat, 2,5 g glükóz, 5 g NaCl, 2,5 g Na₂HPO₄ 1 l deszt. vízben), valamint LB tápagart használtunk. Az állatkísérletekben a szervinvázió és a bél baktérium titer értékek meghatározásához Rappaport-Vassiliadis (RV) szelektív dúsítót (táplevesként valamint a hígításokhoz) és Brómtimolkékes (BTK) differenciáló tápagart (Merck) (a baktérium titer meghatározásához) használtunk a szalmonelláknak a háttérflórától ezúton való könnyebb elkülöníthetősége miatt. Az antibiotikumokat (*Sigma*) minden esetben az alábbi koncentrációban használtuk: nalidixinsav (Nal): 50 µg/ml, spektinomycin (Spe): 50 µg/ml, kloramfenikol (Cm): 20 µg/ml. A kanamycin (Km) esetében 250 µg/ml volt a sejt kultúrák esetében alkalmazott koncentráció.

A sejt inváziós és IL-8 indukciós vizsgálatok során médiumként 5% magzati borjú savóval kiegészített MEM-et (Minimum Essential Medium) (*Sigma*), míg interakciós médiumként 1% D-mannózzal és 5% magzati borjú savóval kiegészített DMEM-et (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (*Sigma*) használtunk.

A sejtek feltárásához használt lízis oldat összetétele a következő volt: 0,025% tripszin és 1% Tween 20 feloldva 0,01 M NaH₂PO₄ (pH=8) oldatban.

5.2.3. *in vitro* sejt inváziós kísérletek

A sejt inváziós kísérletek (Barrow és Lovell, 1989) Vero és csirke embrió fibroblaszt (CEF-chick embryo fibroblast) sejtek felhasználásával zajlottak az alábbiak szerint:

1. A Vero/CEF sejteket háromszor egymás után PBS-sel (Sambrook és mtsai., 1989) mostuk
2. A tesztelendő baktérium egyéjszakás, stacioner TSB levestenyészetét 200-szorosára hígítottuk DMEM (*Sigma*) használatával, ezt használtuk a fertőzéshez. (A pontos kiindulási baktériumszám megállapításához tízes léptékű hígítási sort készítettünk, a hígításokat BTK agar felszínére szélesztettük (inkubáció: 37 C°, O/N).)
3. Az így nyert hígított baktérium kultúra 3ml-ét adtuk a Vero/CEF sejtek tenyészetéhez petricsészében (36 mm átmérőjű, Nunc). A fertőzött sejteket 2 órán át 37 C°-on, 5% CO₂ mellett inkubáltuk.

4. Az inkubáció után a felülúszóból hígítási sort készítettünk, meghatározandó a 2 órás baktérium csíraszámot.
5. A sejteket tartalmazó petricsészékhez 3 ml kanamycinnel kiegészített MEM-et (Sigma) adtunk, majd inkubáltuk 1,5 órán át 37 C°-on, 5% CO₂ jelenlétében.
6. Az inkubáció leteltével eltávolítottuk a MEM-et, majd háromszor mostuk PBS-sel a sejt tenyészetet.
7. Feloldottuk a sejteket 3 ml lízis oldat hozzáadásával (inkubáció: 30 perc 37 C°-on, CO₂ nélkül), majd az inkubáció után pipettával szuszpendáltuk.
8. Az így nyert lizátum felülúszójából hígítási sort készítettünk, majd BTK lemezekre szélesztettük, így határozva meg a Vero/CEF sejtek belsejébe jutott baktériumok számát.

A kanamycin rezisztencia esetleges kialakulását a tesztelt baktériumtörzseken rendszeresen ellenőriztük.

5.2.4. *in vitro* IL-8 indukciós kísérletek

A *Salmonella* törzsek IL-8 indukciós képességét csirke embrió fibroblaszt (CEF) sejteken vizsgáltuk valós idejű (real-time) PCR segítségével. A sejt kultúra indukciója az alábbiak szerint zajlott:

1. A CEF sejteket háromszor egymás után PBS-sel mostuk
2. A tesztelendő baktérium egyéjszakás, stationer TSB levestenyészetét 200-szorosára hígítottuk DMEM (Sigma) használatával, ezt használtuk a fertőzéshez. (A pontos kiindulási baktériumszám megállapításához tízes léptékű hígítási sort készítettünk, a hígításokat BTK agar felszínére szélesztettük (inkubáció: 37 C°, O/N).)
3. Az így nyert hígított baktérium kultúra 3ml-ét adtuk a Vero/CEF sejtek tenyészetéhez petricsészében (36 mm átmérőjű, Nunc). A fertőzött sejteket 4 órán át 37 C°-on, 5% CO₂ mellett inkubáltuk.
4. Az inkubáció után a DMEM-et eltávolítjuk, majd steril PBS-sel háromszor mossuk a sejteket.
5. Hogy a petricsészéről károsodás nélkül leválasszuk a sejteket, a sejt kultúrát 0,25% tripszint tartalmazó PBS 2 ml-ében inkubáljuk 5-10 percig 37°C-on.

A soron következő RNS kivonást a BIO-RAD *Aurum Total RNA Mini Kit*-jével, a cDNS-sé való átírást pedig a *iScript cDNA Kit*-jével végeztük a gyártó útmutatásai szerint.

A Real-time PCR futtatásához BIO-RAD iCycler iQTM típusú készüléket használtunk, az eredmények számítógépes értékelését pedig a Gene Expression MacroTM Version 1.1 program segítségével végeztük.

A reakció elegy összetétele az alábbi volt:

Összetevők:	térfogat:
MQ víz	9 µl
2xiQ TM SYBR Green Supermix (SYBR Green PCR puffer, iTaq DNA polymeráz, dNTP mix, SYBR Green I, 20 nM fluorescein, 6 mM MgCl ₂)	12,5 µl
Primerek 10 pmol/µl	0,75 µl
cDNS templát (10×hígított)	2 µl
teljes térfogat:	25 µl

Az IL-8 (és GAPDH, mint referencia háztartási gén) real-time PCR-hez használt PCR program, melynek első fázisában (az 1-2. szakasz során) az adatgyűjtés és elemzés, míg második részében (a 3-5. szakasz során) az olvadáspont analízis zajlott:

1. szakasz:	(1×)	94,0°C	03:00 perc
2. szakasz:	(40×)		
1. lépés:		94,0°C	00:15 perc
2. lépés:		62,0°C	00:20 perc
3. szakasz:	(1×)	95,0°C	01:00 perc
4. szakasz:	(1×)	65,0°C	01:00 perc
5. szakasz:	(60×)	65,0°C	00:05 perc

Az olvadáspont meghatározás során az 5. szakaszban minden második lezajlott ciklus után 0,5°C-kal emeltük a hőmérsékletet, így jutva el 60 ciklus után 95°C-hoz.

XII. táblázat A real-time PCR-ek során használt primerek szekvenciái

Primer	Szekvencia	Forrás
IL-8 F	CTGCGGTGCC AGTGCATTAG	Sadeyen és mtsai., 2004
IL-8 R	AGTACACCTC TCTTCCATCC	Sadeyen és mtsai., 2004
GAPDH F	TCTACACACG GACACTTCAA GGGC	Szmolka, nem publikált
GAPDH F	TGGACTCCAC AACATACTCA GCAC	Szmolka, nem publikált

5.2.5. Kísérleti állatok és állatkísérleti modell

Az állatkísérletek során hím ivarú Ross típusú naposcsibéket használtunk, melyek a Bábolna Keltető Kft-től, nagyszülői SPF (*Salmonella* és más kórokozóktól mentes) tenyészállományból és vegyes ivarú White Leghorn fajtájú SPF naposcsibéket, melyek a CEVA Rt-től származtak. A naposcsibéket a keltetés napján szállítottuk intézetünkbe, ahol érkezésük után véletlenszerűen, azonos számú egyedből álló csoportokba osztottuk őket. A szerv inváziós vizsgálatokhoz 44 x 40 cm-es alapterületű műanyag dobozokban hat egyedes csoportokban tartottuk a madarakat hat napos korukig, míg a védőhatás vizsgálata során elkülönített termekben, negyvenes induló létszámmal dolgoztunk. A kísérlet során antibiotikum mentes baromfi befejező tápot (Rákoskeverő Kft) kaptak ad libitum.

Szerv inváziós és kolonizációs képességek vizsgálata

A naposcsibék a kikelésük napján, érkezésüktől számított egy órán belül lettek fertőzve a megfelelő baktérium szuszpenziójával. A fertőzéshez a vizsgálandó baktérium törzs stacioner, antibiotikum mentes leves tenyészetét (37 C°, O/N) kétszeresére vagy húszszorosára (kísérlettől függően) hígítottuk LB levessel. Az így nyert hígított tenyészet 0,5 ml-ével, steril begyszonda segítségével egyedileg fertőztünk minden kísérleti állatot. A fertőzés során körülbelül $1-2 \times 10^7$ CFU vagy $1-2 \times 10^8$ CFU mennyiségű baktérium került az állatok emésztőrendszerébe, attól függően, hogy milyen dózisu fertőzést tartottunk célszerűnek vizsgálni. A csibék a fertőzés előtt csak vizet kaptak, takarmányhoz (melyet *Salmonella* és antimikrobiális anyag mentességre akkreditált laboratóriumban ellenőriztettünk) először a fertőzés után egy órával jutottak.

Az állatokat a fertőzést követő ötödik napon dolgoztuk fel. Az általános sebészeti sterilitás szabályait betartva eltávolítottuk a kísérleti állatok lépét, májának egy körülbelül 0,2 grammos szeletét és vakbelét. A májat és a lépét homogenizálva tízszeres mennyiségű, megfelelő antibiotikummal kiegészített RV szelektív dúsítóba tettük, majd 48 órán át inkubáltuk 41 C°-on. Ebből oltottunk ki steril kaccsal 24 és 48 óra elteltével antibiotikus BTK agarra, így tesztelendő a szalmonellák megjelenését a madarak szerveiben.

Az állatok vakbél tartalmából ugyancsak 0,2 grammot mértünk ki, majd ebből a béltartalomtól antibiotikummal kiegészített RV dúsítóban tízes alapú hígítási sort készítettünk. A hígítási sor minden lépéséből azonnal 10 µl-t egy antibiotikus BTK agar harmadára szélesztettünk steril oltókacs segítségével, majd a lemezeket 37 C°-on éjszakán át inkubáltuk. A másnapra kinőtt *Salmonella* telepeket megszámlálva határoztuk meg a csibék vakbelében lévő baktérium títert.

Minden kísérlet esetében használtunk intakt kontroll csoportot, amelyet ugyanolyan körülmények között tartottunk, mint a kísérleti csoportokat, attól eltekintve, hogy nem lettek fertőzve. A csoport feldolgozása némiképp eltérően zajlott a kísérleti csoportokétól, hiszen itt nem vizsgáltuk a szervek fertőzöttségét, csupán a vakbél tartalom 0,2 grammját oltottuk antibiotikum mentes RV szelektív dúsítóba, amelyet 41 C°-on inkubáltunk. Ebből a dúsítóból oltottunk ki steril oltókaccsal 24 és 48 óra elteltével antibiotikum mentes BTK lemezekre. Ezeket egy éjszakán át 41 C°-on inkubáltuk, majd másnap vizsgáltuk a *Salmonella* gyanús telepek megjelenését. Az esetleges gyanús telepek minősítését *Salmonella* D csoportsavóval és polivalens *Salmonella* antisavóval továbbá szükség esetén a törzs biokémiai tulajdonságainak vizsgálatával tisztáztuk.

A korai védőhatás és az ártalmatlanság vizsgálata

A védőhatás vizsgálatához a kísérleti állatokat két (egy első, „vakcina”, és egy második, „challenge”) törzssel egymás után fertőztük. Az első fertőzés az érkezés napján történt $1-2 \times 10^8$ CFU mennyiségű *Salmonellával*, hasonlóan mint az inváziós vizsgálatok során (lásd fenn). Ezt követte a „challenge” SE 147 Nal^R törzssel való ráfertőzés, amelyre 24 órával a „vakcina” törzs után került sor. A „challenge” törzset – életszerűen – kisebb dózisban kapták a madarak: a törzs stacioner, egyéjszakás LB leves tenyészet 1000-szeres hígításának 0,5 ml-ét kapták az állatok ($1-2 \times 10^5$ illetve $1-2 \times 10^6$ CFU/csibe) steril begyszonda segítségével. A kísérleti elrendezést a XII. táblázat mutatja.

XIII. táblázat A védőhatás vizsgálatának kísérleti elrendezése és a fertőzési csíraszámok

Csoport	Vakcina törzs		Challenge törzs	
	Név	Fertőzés [CFU/csibe]	Név	Fertőzés [CFU/csibe]
1. Vakcina kontroll 1	SE11 Spc ^R	10 ⁸	-	-
2. Principális 1	SE11 Spc ^R	10 ⁸	SE 147 Nal ^R	10 ⁵
3. Challenge kontroll	-	-	SE 147 Nal ^R	10 ⁵
4. Principális 2	SE Δ155 Cm ^R	10 ⁸	SE 147 Nal ^R	10 ⁵
5. Vakcina kontroll 2	SE Δ155 Cm ^R	10 ⁸	-	-

A kísérleti minták feldolgozása a szerv inváziós és kolonizációs vizsgálatokhoz képest néhány kisebb módosítással történt. A vakbél tartalom feldolgozása a korábbiakhoz hasonlóan zajlott; a vakcina kontroll csoportoknál spektinomycin és kloramfenikol tartalmú, míg a ráfertőzött („challengelt”) csoportok esetében nalidixinsav tartalmú RV dúsítót és BTK táptalajt használtunk a hígítás illetve kioltás során, hogy mind a „vakcina”, mind a „challenge” törzs csíraszámát meghatározhassuk. Hasonlóan jártunk el a máj mintákkal is, melyeket egy homogenizálási lépés után a vakbél tartalomhoz hasonlóan hígítottunk és titráltunk. A máj homogenizálását steril műanyag tasakban, 50-szeres mennyiségű RV dúsítóban, Stomacher (Seward Stomacher 80 Biomaster) homogenizátorral végeztük. A lép minták feldolgozása az előkísérletekben leírtaknak megfelelően zajlott, kivéve a 48 órás kioltásokat, amelyet ezúttal elhagytunk.

A bakteriológiai mintavételi eljárást kiegészítettük a kloákatamponok gyűjtésével, melyet a többi vizsgálattal egyidőben végeztünk úgy, hogy a feldolgozásra került állatoknak mindig legyen kloákatampon eredménye is. A mintavételre kereskedelmi forgalomban kapható, steril fültisztítót használtunk, melyet mintavétel után RV dúsítóban inkubáltunk 24 órán át, majd ebből antibiotikus BTK-ra szélesztettünk, így vizsgálva a madarak *Salmonella* ürítését.

A kísérleti állatok első hatos csoportját a fertőzést követő ötödik napon dolgoztuk fel. Ezt követően minden újabb hét elteltével megismételtük a feldolgozást a fenti séma szerint, mindig 6-6 állatot felhasználva csoportonként, egészen a negyedik hétig.

A negyedik hét végén, az utolsó feldolgozás alkalmával a Vakcina kontroll csoportokban vért vettünk, az állatok *Salmonella* flagellin specifikus immunválaszát tesztelendő. A savókat szendvics blokkoló ELISA-val (DAS ELISA) (van Zijderveld és mtsai., 1993), a *S. Enteritidis*

flagellin specifikus 9G3 monoklonális ellenanyag segítségével vizsgáltuk (Szmollény és mtsai., 1999).

Statisztikai elemzés

Az *in vitro* sejtinváziós eredmények és az *in vivo* korai védőhatást vizsgáló kísérletek eredményeinek statisztikai analízisét egyutas variancia analízissel kombinált T-próba alkalmazásával végeztük.

5.3. Eredmények

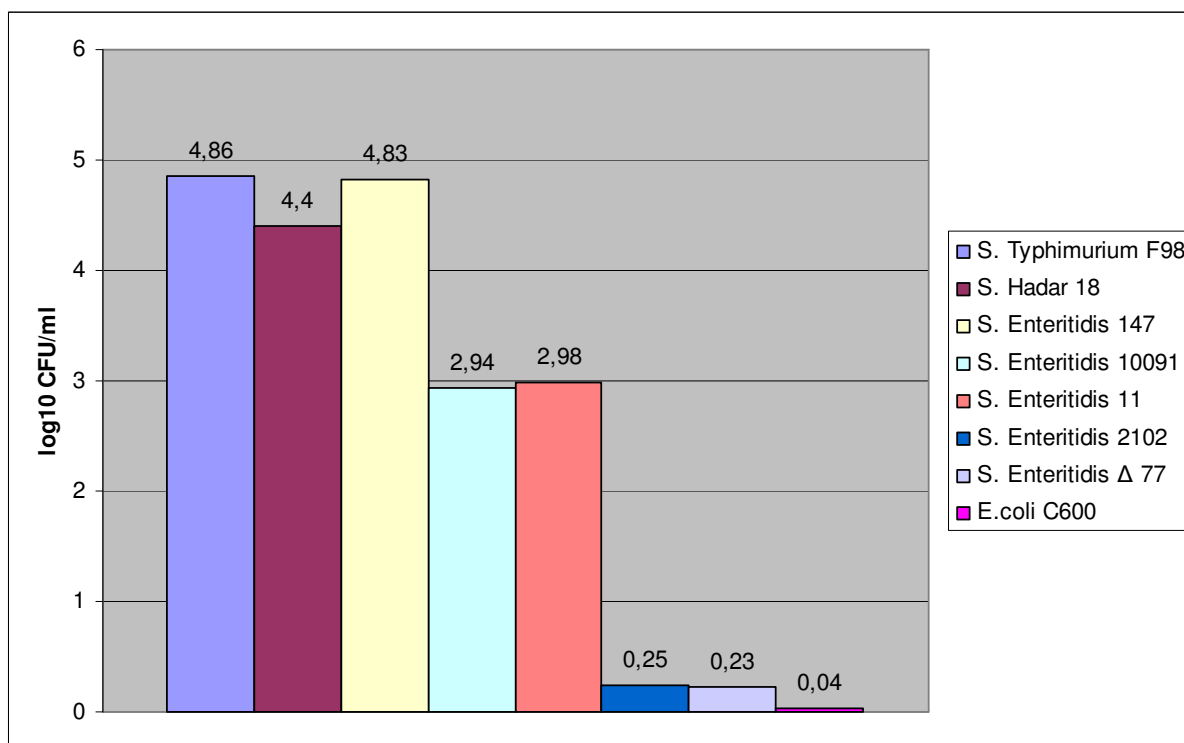
5.3.1. Az *in vitro* sejtinváziós és IL-8 indukciós vizsgálatok eredményei

Inváziós eredmények Vero sejteken. A *Salmonella* Enteritidis 11 törzs markerezési és virulencia csökkentési lépései során az első, az állatkísérleteket megelőző virulencia teszt a sejtinváziós vizsgálat volt, melyet Vero sejteken végeztünk (17. ábra). Az inváziós vizsgálatok során a gyakoribb *Salmonella* szerovariánsok képviselőihez (*S. Typhimurium* F98, *S. Hadar* 18), különböző *S. Enteritidis* reprezentánsokhoz (*S. Enteritidis* 147, *S. Enteritidis* 10091) és a nem invázív *E. coli* K-12 kontrollhoz hasonlítottuk SE11 mutánsainkat. Eredményeinket a 14. ábrán foglaltuk össze.

Az általunk használt modellben a kísérletben szereplő törzsek közül a *S. Typhimurium* F98 bizonyult a leginvázívabbnak, amely $4,86 \log_{10}$ CFU/ml ($7,24 \times 10^4$ CFU/ml) élő csíraszámot ért el a Vero sejtek belsejében. Nem sokkal maradt el ettől az értéktől a *S. Enteritidis* 147 ($4,83 \log_{10}$ CFU/ml) és a *S. Hadar* 18 ($4,4 \log_{10}$ CFU/ml) sem, így ez a három törzs képezte a vizsgálatba vont törzsek leginvázívabb csoportját.

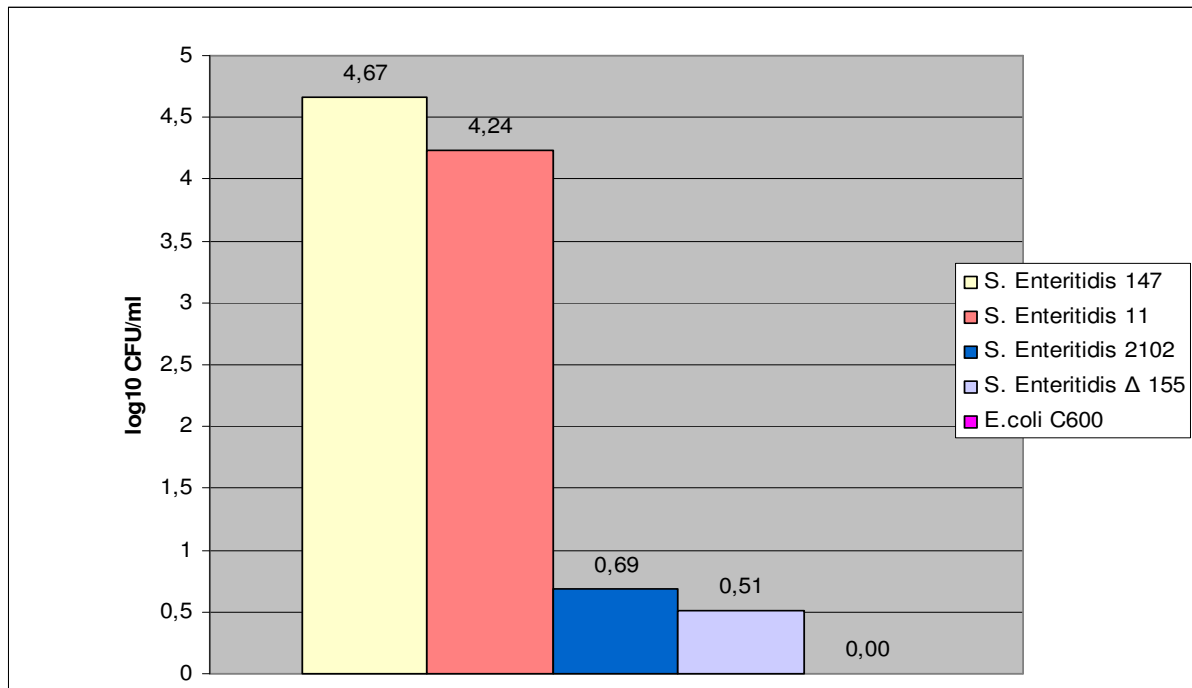
A fentiekhez képest átmeneti (köztes) inváziós csíraszámot mutatott a *S. Enteritidis* 10091 ($2,94 \log_{10}$ CFU/ml) és a *S. Enteritidis* 11 ($2,98 \log_{10}$ CFU/ml) szülői törzs, melyek körülbelül két nagyságrenddel alacsonyabb titert értek el, mint a leginvázívabb *S. Typhimurium* F98.

A *Salmonella* törzsek közül a legalacsonyabb inváziós képességgel a SE11 mutánsai rendelkeztek, a flagella mentes SE2102 $0,25 \log_{10}$ CFU/ml-es értéket, míg a virulencia plazmid mentes SE2102 származék SE Δ 77 ezzel szinte megegyező $0,23 \log_{10}$ CFU/ml-es értéket mutatott. Ezen inváziós értékek alapján mindkét mutáns szignifikánsan különbözik a szülői SE11 törzstől (SE2102: $P=0,018$; SE Δ 77: $P=0,013$), azonban a két mutáns inváziós képességei között nincs szignifikáns eltérés: $P=0,734$). Ezek az inváziós értékek azt jelzik, hogy a fenti két mutáns *in vitro*, Vero sejteken gyakorlatilag nem invázív, hiszen ezeknél az értékeknél alacsonyabbat csak a negatív kontroll *E. coli* C600 mutatott ($0,04 \log_{10}$ CFU/ml).



17. ábra A *S. Enteritidis* 11 mutánsok, valamint a fontosabb *Salmonella* szerovariánsok egy-egy reprezentáns törzsének inváziós értékei Vero sejt modellen. Az inváziós értékek a Vero sejtek belsejében mérhető élő *Salmonella* csíraszám tízes alapú logaritmusát mutatják. (Az eredmények legalább két párhuzamos kísérlet adatain alapulnak.)

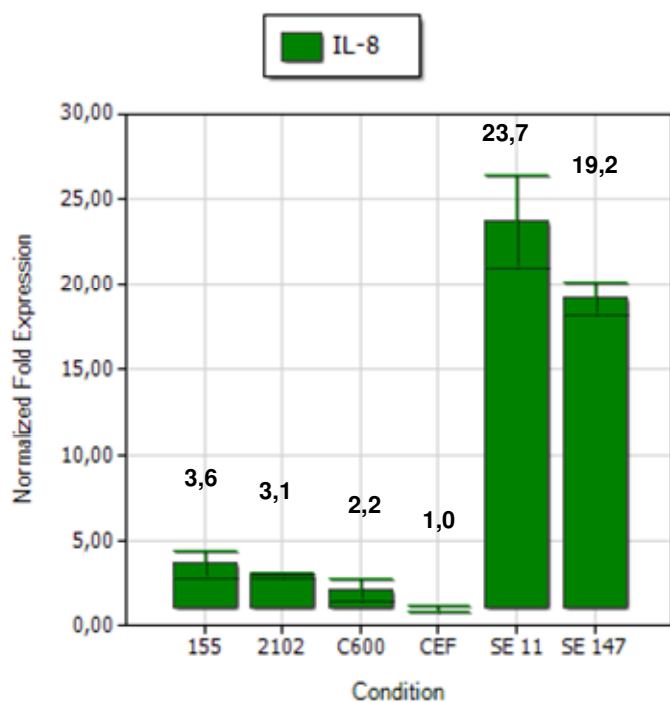
Inváziós eredmények CEF (chicken embryo fibroblast) sejteken. A Vero sejteken való tesztelést követően fölmerült a kérdés, hogy a gazda-specifikus sejtenyészet is alkalmas-e a *Salmonella in vitro* invázió tanulmányozására? Ezért CEF primér sejteken is megvizsgáltuk a mutánsaink inváziós képességét (18. ábra). Invázió pozitív kontrollként ezúttal a *S. Enteritidis* 147-es törzs szolgált, amely ismét a Vero sejt invázióhoz hasonló, magas értékeket mutatott (4,67 log₁₀ CFU/ml). Érdekes, hogy a SE11 szülő törzs ezúttal több mint egy nagyságrenddel magasabb inváziós értéket mutatott, mint Vero sejteken (4,24 log₁₀ CFU/ml). Ennek mutánsai viszont a CEF-en is igen kevésbé voltak invázívak: a SE2102 0,69 log₁₀ CFU/ml-t, a plazmidmentes SEΔ155 0,51 log₁₀ CFU/ml-t ért el. Adataink alapján a szülői SE11 törzstől mind az SE2102 (P=0,0035), mind a SEΔ155 (P=0,006) jelentősen eltért a CEF inváziós tulajdonságaik tekintetében, mígy a két mutáns között nem volt szignifikáns különbség (P=0,5315).



18. ábra A *S. Enteritidis* 11 szülői törzs, a SE2102 nem mozgó, és a SEΔ155 virulencia plazmid mentes mutánsok inváziója, CEF (chicken embryo fibroblast) modellen. Az inváziós értékek a CEF sejtek belsejében mérhető élő *Salmonella* csíraszám tízes alapú logaritmusát mutatják. (Az eredmények két párhuzamos kísérlet adatain alapulnak.)

Interleukin-8 (IL-8) indukciós eredmények CEF (chicken embryo fibroblast) sejteken.

A sejt inváziós vizsgálatokat követően kíváncsiak voltunk arra is, hogy legfontosabb törzseink milyen mértékben képesek kiváltani az egyik legfontosabb lázkeltő citokin, az interleukin-8 termelődését. A vizsgálatokhoz CEF kultúrát használva, a sejtek baktérium indukálta IL-8 termelését pedig RNS szinten, real-time RT PCR segítségével próbáltuk nyomon követni. Eredményeinket a 19. ábra oszlopdiagramja foglalja össze.



JELMAGYARÁZAT:

155: SE Δ 155-tel kezelt CEF
 2102: SE2102-vel kezelt CEF
 C600: Ec C600-zal kezelt CEF
 CEF: kezeletlen kontroll CEF
 SE11: SE 11-el kezelt CEF
 SE147: SE 147-tel kezelt CEF

19. ábra IL-8 indukciós real-time PCR eredmények CEF (chicken embryo fibroblast) sejteken. A grafikon a kezeletlen kontroll sejt kultúra (CEF) IL-8 mRNS szintjéhez normalizálva (ezt egynek véve) mutatja a különböző baktériumokkal kezelt sejttenyészetek IL-8 mRNS szintjét.

Eredményeink szerint a mutáns *Salmonella* törzsekkel kezelt CEF sejt kultúrák IL-8 termelése jelentősen alacsonyabb a szülői törzs által kiváltott IL-8 termelésnél. A 18. ábra alapján megfigyelhető, hogy míg a vad *S. Enteritidis* törzsek IL-8 indukciója mintegy 20-szorosán haladta meg a fertőzetlen CEF kultúra IL-8 termelését, addig a mutáns törzsek (SE2102, SE Δ 155) esetében ez az érték mindössze 3-4-szeres. Ha a nem invázív *E. Coli* C600-as törzs indukcióját tekintjük alapértéknek, akkor a szülői SE11 törzs IL-8 indukciója több mint tízszeresen, míg a mutánsoké mindössze 1,5-szeresen haladta meg az ártalmatlan laboratóriumi *E. coli* törzs interleukin indukcióját.

5.3.2. A naposcsibe szerv inváziós és vakbél kolonizációs kísérletek eredményei

Az *in vivo* kísérletek során elsőként az irányított transzpozon mutagenézissel létrehozott nem mozgó törzsek virulenciáját vizsgáltuk meg. Ezen előkísérletek során három olyan flagella mentes mutánst teszteltünk, melyek potenciális kiinduló törzsei lehettek a további virulencia

csökkentő munkáknak, azonban először tisztázni szeretnénk volna a reziduális virulenciájukat és kolonizációs képességeiket. Törzseink virulenciájának vizsgálatához naposcsibe modellt használtunk, a kísérletek során a baktériumok virulenciáját a belső szervekbe (máj, lép) történő invázió mértékével, míg a kolonizációs képességeket a vakbél tartalomban elért csíraszámokkal jellemeztük. Összehasonlítási alapként a vad típusú szülői SE11 törzset (pozitív kontroll) és a kereskedelmi forgalomban legrégebb óta elérhető, teljes mértékben ártalmatlannak ismert *S. Typhimurium* Zoosaloral-H (Dessau-Tornau GmbH) élő vakcina törzset (negatív kontroll) használtuk.

Összesen három vizsgálatot végeztünk az előkísérletek során, melyek eredményei összevontan a XIV. táblázatban láthatók. A két kontroll törzs (a szülői SE11 és a ST Zoosaloral), valamint a SE2102 jelű nem mozgó törzs mindhárom vizsgálatban szerepelt, így ezekről összesen 18-18 állatból gyűjtöttünk adatokat. A másik két nem mozgó mutáns, a SE 2107 és a SE 2520 csak egy kísérletben szerepelt, így ezek esetében csupán 6 állatból származó vizsgálati adat áll rendelkezésre, amint azt a XIV. táblázat is mutatja.

A vakbélben mért *Salmonella* csíraszámok tekintetében a ST Zoosaloral kontroll törzs mutatta a legalacsonyabb értéket ($4,4 \log_{10}$ CFU/g bél tartalom), ennél hozzávetőlegesen két nagyságrenddel magasabb titert ért el a szülői SE11 ($6,5 \log_{10}$ CFU/g). Érdekes módon a legmagasabb csíraszámot a nem mozgó (flagella mentes) mutánsok mutatták, melyek mindegyike magasabb titert ért el a naposcsibék vakbelében, mint a vad típusú szülői törzs. Az értékek $6,82$ és $8,37 \log_{10}$ CFU/g között változtak, a legmagasabb értéket a SE2102 jelű nem mozgó mutáns érte el.

Némiképp meglepő eredményeket mutattak a szervinváziós adatok is, melyek során azt vizsgáltuk, hogy a kísérleti állatok szerveiből a fertőzéshez használt *Salmonella* törzs milyen arányban tenyészthető ki. Talán a legszembeötlőbb eredmény, hogy a három, azonos genetikai háttérű nem mozgó mutáns igen eltérő értékeket mutat mind a máj, mind a lép invázió tekintetében. A mindhárom kísérletben szereplő SE2102 mutáns sokkal invázívabban viselkedett (máj: 33%-os pozitívítás, lép: 100%-os pozitívítás), mint izogén mutánstársai (máj: 0-16%, lép: 50-66%-os pozitívítás), és elérte illetve meghaladta a vad típusú, szülői SE11 törzs inváziós értékeit (máj: 33%, lép: 61% pozitív) is. Ha csupán a másik két flagella mentes mutánst tekintjük, akkor az előkísérletek alapján az inváziós képességek stagnálást, illetve a májak esetében enyhe csökkenést mutatnak a szülői SE11 törzshöz képest, míg a SE2102-es mutáns ezzel némileg ellentétes tendenciát mutatott.

Érdekes, nem várt eredménynek tartottuk az SE11 törzs és származékai esetében azt is, hogy a lép-inváziós értékeik rendre magasabbnak bizonyultak a máj invázióval, hiszen ez

ellentmondani látszik a szerv invázió esetén természetesnek tartott bél - máj - limfoid szervek sorrendjével. Szintén érdekes volt látni, hogy az általunk használt kísérleti rendszerben a kereskedelemben kapható ST Zoosaloral vakcina törzs is jelentős (máj: 55%, lép: 50%) reziduális inváziós képességgel rendelkezik. Mindezek tárgyalására a későbbiekben még visszatérünk.

XIV. táblázat Az irányított transzpozon mutagenézissel előállított nem mozgó *S. Enteritidis* 11 törzs mutánsainak (SE2102, SE2107 és SE2520) szerv inváziós és vakbél kolonizációs tulajdonságai naposcsibében (SPF Ross fajtájú csibék, fertőzési csíraszám: $1-2 \times 10^7$ CFU/csibe) 24 és 28 órás szelektív dúsítást követően.

	SE11	SE2102	SE2107	SE2520	ST Zoosaloral
Máj	6/18	6/18	0/6	1/6	10/18
[pozitív/vizsgált]	33%	33%	0%	16%	55%
Lép	11/18	18/18	3/6	4/6	9/18
[pozitív/vizsgált]	61%	100%	50%	66%	50%
Vakbél titer [log ₁₀ CFU/g]	6,55	8,37	6,82	8,02	4,41

Az előzetes kísérletek eredményei szerint tehát a flagella mentes SE11 származékok a szülői törzshöz képest nem mutattak egyértelmű és általános virulencia csökkenést, így ezt további genetikai beavatkozással, a virulencia plazmid kiűzésével (lásd 4. fejezet) reméltük elérni. A munka folytatásához a SE2102 törzset választottuk ki, mely ugyan invázívabb volt, mint a másik két mutáns törzs, de mellette szólt, hogy a SE2102-ről rendelkezünk a legtöbb állatkísérleti adattal (három párhuzamos kísérlet eredményei), valamint ez a törzs mutatta a legjobb kolonizációs képességet, amit egy élő, orális vakcina jelölt törzs esetében igen fontos szempontnak tartottunk.

Az *in vivo* ártalmatlansági vizsgálatok következő fázisában így a nem mozgó, virulencia plazmid üzött mutánsok játszották a központi szerepet, míg szülői kontroll törzsként a SE11 mellett a SE2102 flagella mentes mutáns szerepelt. A plazmid üzött változatok közül a SEΔ77 és a SEΔ155 teljesen mentes volt a virulencia plazmidtól, míg a SEΔ211 jelű törzs egy olyan deléciós virulencia plazmidot hordozott, amelyről hiányoztak a fő virulencia determináns *spvRABCD* gének (4. fejezet, 12.ábra).

Az állatkísérleti rendszer megegyezett az előkísérletek során alkalmazott naposcsibe modellel, azzal a módosítással, hogy a korábbi SPF Ross naposcsibékről SPF White Leghorn fajtára tértünk át tekintettel arra, hogy az irodalomban is ilyen csibék felhasználásáról szóló közlemények szerepeltek (Methner és mtsai., 1995). Két párhuzamos vizsgálatot végeztünk; első alkalommal 10^7 CFU/csibe, másodsorra 10^8 CFU/csibe fertőző dózist alkalmaztunk. A mintavétel menete azonban nem változott a korábbiakhoz képest, a máj és a lép fertőzöttségét kvalitatívan vizsgáltuk, míg a vakbél kolonizáció mértékét csíraszámolással határoztuk meg. A vizsgálatok eredményeit a XV A-B. táblázatban foglaltuk össze.

XV A-B. táblázat A *S. Enteritidis* 2102 nem mozgó törzs plazmid üzött változatainak (SE Δ 77, SE Δ 155, SE Δ 211) szerv inváziós és vakbél kolonizációs tulajdonságai összehasonlítva a különböző szülői törzsekkel (SE11: vad típusú szülői törzs, SE2102: nem mozgó szülő). A vizsgálatokat a CEVA-tól származó, SPF White Leghorn naposcsibéken végeztük.

A) Fertőző dózis: 10^7 CFU/csibe.

	SE11	SE2102	SEΔ77	SEΔ155	SEΔ211
Máj	6/6	2/6	3/6	3/6	1/6
[pozitív/vizsgált]	100%	33%	50%	50%	16%
Lép	6/6	1/6	3/6	2/6	3/6
[pozitív/vizsgált]	100%	16%	50%	33%	50%
Vakbél titer [log ₁₀ CFU/g]	6,3	5,7	6,7	7,0	6,4

B) Fertőző dózis: 10^8 CFU/csibe.

	SE11	SE2102	SEΔ77	SEΔ155	SEΔ211
Máj	6/6	3/6	3/6	6/6	3/6
[pozitív/vizsgált]	100%	50%	50%	100%	50%
Lép	6/6	5/6	4/6	3/6	5/6
[pozitív/vizsgált]	100%	83%	66%	50%	83%
Vakbél titer [log ₁₀ CFU/g]	8,5	7,8	8,6	8,2	7,8

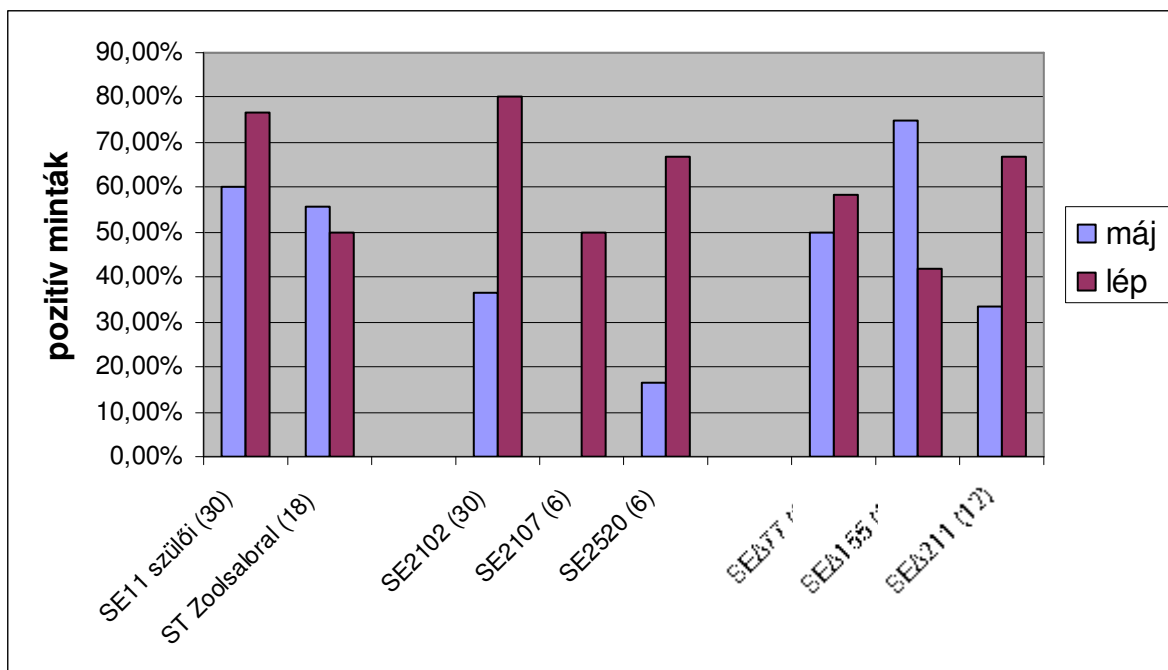
A kísérletek eredményeit értékelve megállapíthatjuk, hogy a két vizsgálat eredményei a fertőző *Salmonella* dózis jelentős (egy nagyságrendnyi) emelése ellenére azonos tendenciát mutatnak. A legvirulensebb törzsnek ezúttal a szülői SE11 bizonyult, hiszen folyamatosan 100%-os szerv pozitivitást okozott a két kísérlet során. Ehhez képest a korábbiakban invázívabbnak tűnő SE2102 nem mozgó mutáns ezúttal kb. feleakkora inváziót mutatott mint

a szülő SE11. Ez az eredmény megerősítette eredeti várakozásainkat, amelyeket az előzetes szerv inváziós eredmények részben cáfolni látszottak, hiszen ott ez a nem mozgó mutáns a lépre nézve invázívabbnak mutatkozott, mint a SE11 (XIV. táblázat), mely relatív eltérést a szülői SE11-es törzs ezen (White-Leghorn) SPF csibékben mutatott magasabb szerv-inváziós értékeivel magyarázhatjuk. Ennek okát viszont az esetlegesen hiányzó vagy gyenge *E. coli* flórában kereshetjük.

A plazmid mentes mutánsok jelentős csökkenést mutattak a vad SE11 szülőhöz képest mind a máj, mind a lép invázió tekintetében, míg a SE2102 törzshöz viszonyítva csupán a lép invázió tekintetében figyelhető meg enyhe csökkenés. Egymással való összehasonlításban a plazmid mentes mutánsok esetében viszonylag egyenletes értékeket figyelhetünk meg: egyedül a SEΔ155 máj inváziója mutat kiugró (100%-os) értéket, azonban ez az érték valószínűleg a csibék közti egyedi érzékenységi különbségeknek és az alacsony mintaszámnak köszönhető, hiszen a SEΔ155 és SEΔ77 azonos genetikai háttérű plazmid mentes mutánsok.

A két eltérő csíraszámú történt fertőzést összevetve a fertőzési dózis hatása mind a szerv invázió, mind a vakbélben mért *Salmonella* titer esetén egyértelműen megmutatkozik. A magasabb (10^8 CFU) csíraszámú való második fertőzést követően – a várakozásnak megfelelően - a vakbél titer 1,2-2,2 nagyságrenddel, míg a szervinvázió csoportonkénti 0-4 pozitívással haladta meg az első kísérlet azonos csoportját.

Az ártalmatlansági vizsgálatok során elvégzett, összesen öt különálló állatkísérlet néhány paraméterében (fertőző dózis, naposcsibe fajtája) eltért ugyan egymástól de a törzsek egymáshoz viszonyított különbségeinek hasonlósága alapján legalább az inváziós eredményeik összevonhatók. Így a kísérleti elrendezésből adódó esetleges kilengéseket is kiegyensúlyozhatjuk. A könnyebb áttekinthetőség kedvéért ezt az összesítést végeztük el a 20. ábra grafikonján, melyen az egyes törzsekre vonatkozó szerv pozitívítások százalékos értékei láthatók.



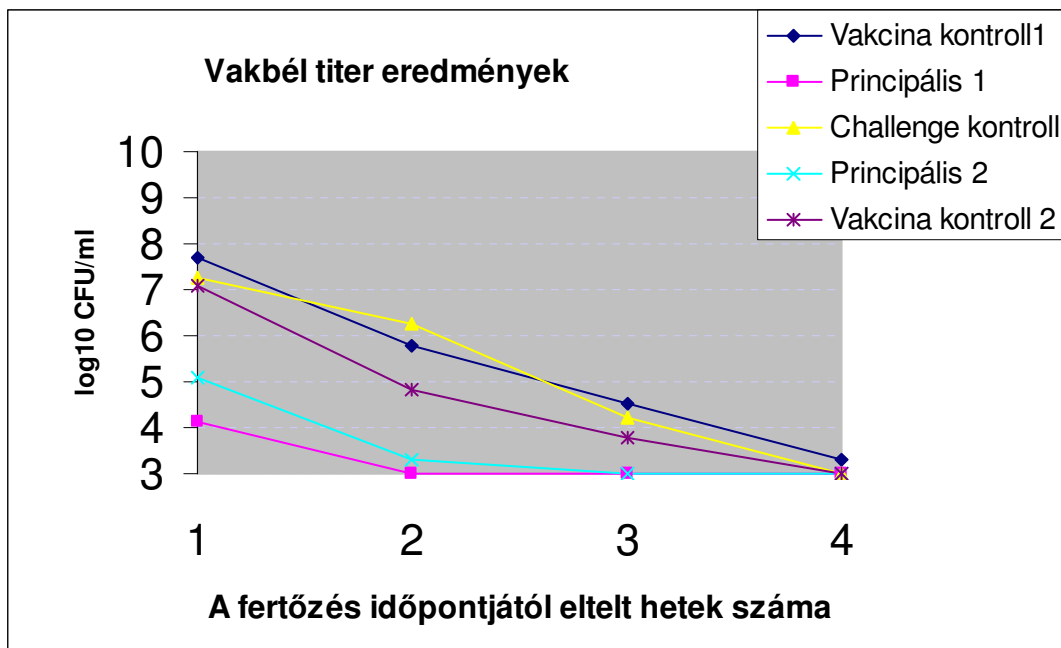
20. ábra A *S. Enteritidis* 11 és származékainak összesített szerv inváziós eredményei SPF Ross és White Leghorn naposcsibéken, 10^7 - 10^8 CFU/csibe fertőzési csíraszámmal. A törzsek neve melletti zárójeles érték az összes vizsgált szerv számát mutatja.

Az összesített eredmények szerint a szülő SE11 törzs stabil, magas inváziókat mutat mind a máj (60%), mind a lép (76%) minták esetében. Ezeknél az értékeknél a nem mozgó mutánsok, és ezek plazmid mentes származékai is rendre alacsonyabb értékeket mutattak, eltekintve egy-egy kiugróan magas lép vagy máj inváziótól. Végülis tendenciájában egyértelműen csökkenő virulenciát mutatnak mind a flagella mentes, mind a flagella és plazmid mentes törzsek.

5.3.3. Korai védőhatás és ártalmatlanság

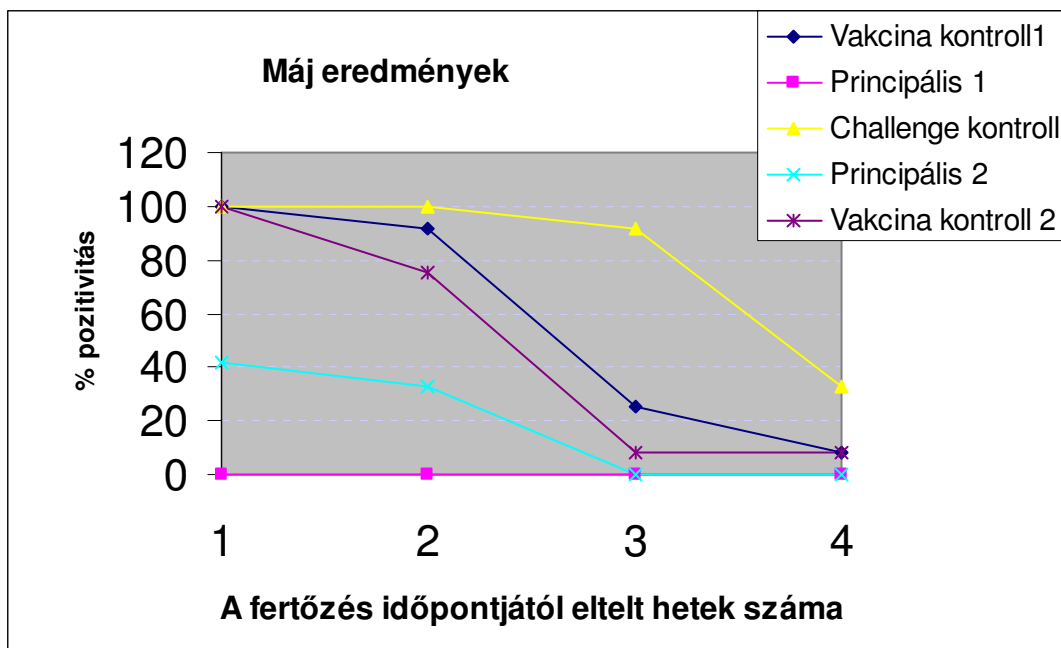
Miután mutánsaink az öt napos időtartamú rövid távú naposcsibe modell kísérletekben csökkent virulenciát mutattak úgy gondoltuk, hogy a munka ezen fázisában érdemes megvizsgálni korai védőhatásukat és ürülési tulajdonságaikat. Ugyanakkor nyilvánvalónak tűnt, hogy egy hosszabb időtartamú kísérlet keretein belül is meg kell vizsgálni ártalmatlanságukat. Ennek érdekében ismét frissen kikelt naposcsibéket fertőztünk a vakcina jelölt SEΔ155 és – kontrollként – a szülői SE11 törzsszel, majd egy nappal később a virulens *S. Enteritidis* 147-tel, mint challenge (ráfertőző) törzsszel kezeltük az állatokat. Az állatok ismét Ross típusú húshibridek voltak (Bábolna).

A fenti kérdések vizsgálata céljából két kísérletet végeztünk, melyek egyrészt abban tértek el, hogy a *S. Enteritidis* 147-es törzs challenge dózisa az első kísérletben 2×10^5 CFU/csibe, míg a második kísérletben 2×10^6 CFU/csibe volt. További eltérésként a második kísérletben a máj és a lép *Salmonella* tartalmát kvantitatívan is vizsgáltuk. Tekintettel arra, hogy ezen challenge dózis különbség az egyes csoportok közötti különbségeket nem befolyásolta, az adatok kísérletenkénti részletes bemutatása mellett (1. kísérlet: XVI. táblázat, 2. kísérlet: XVII. táblázat) eredményeinket összevontan, négy háló diagram formájában mutatjuk be (21., 22., 23., 24. ábra).

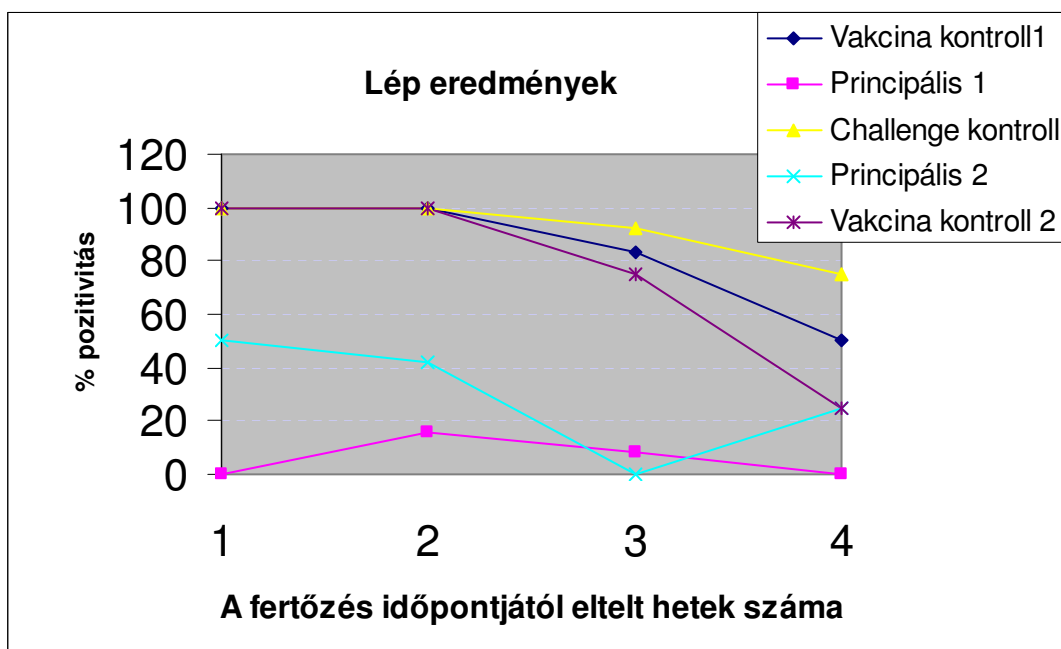


21. ábra A korai védőhatást vizsgáló kísérletek összevont vakbél titer eredményei. A grafikon a vakbélben mért *Salmonella* csíraszám tízes alapú logaritmusának átlagát mutatja (2x6 csibe/időpont/csoport) (Vakcina kontroll 1: csak SE11-el kezelt, Principális 1: SE11-el „vakcinázott”, SE147-tel „challengelt”, Challenge kontroll: csak SE147-tel kezelt, Principális 2: SE Δ 155-tel „vakcinázott”, SE147-tel „challengelt”, Vakcina kontroll 2: csak SE Δ 155-tel kezelt. A kísérleti elrendezést lásd még: XIII. táblázat.)

Ezek szerint a vakbél titerek alapján a két vakcinázott csoport (Principális 1 = SE11 szülői törzsszel „vakcinázott”) és (Principális 2 = SE Δ 155 nem mozgó, plazmid mentes mutánszal „vakcinázott”) szignifikáns védelmet nyújtott a challenge törzs ellen az 1. és a 2. héten (21. ábra).

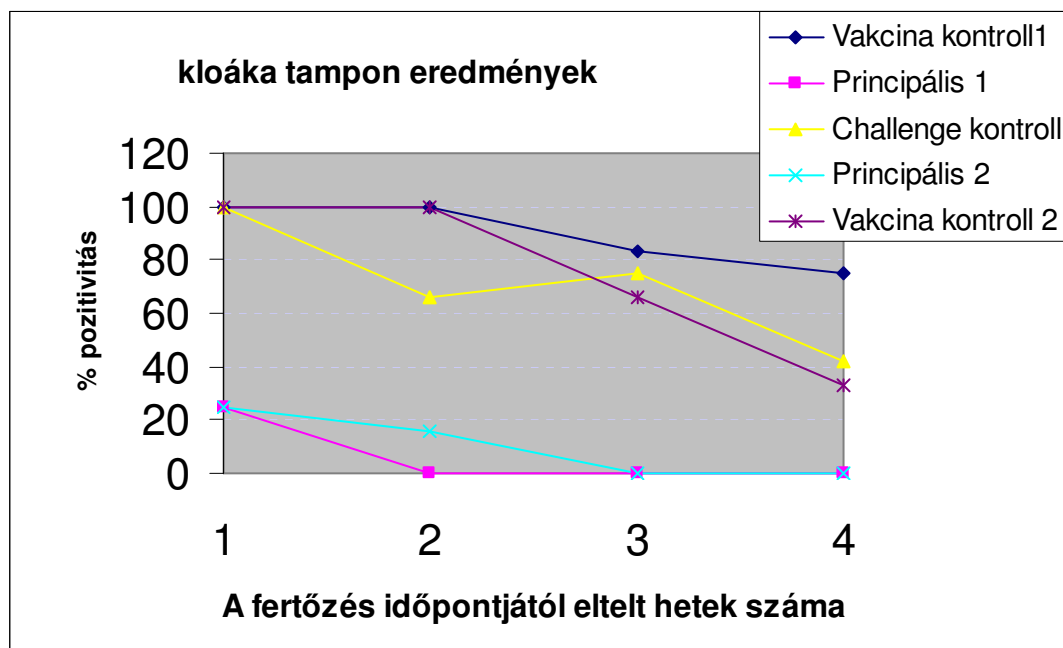


22. ábra A korai védőhatást vizsgáló kísérletek összevont máj inváziós eredményei. A grafikon a pozitív szerv minták arányát mutatja az összes (2x6 csibe/időpont/csoport) vizsgálthoz képest. (Csoportnevek feloldása lásd: 21. ábra aláírás, részletes kísérleti elrendezés: XIII. táblázat.)



23. ábra A korai védőhatást vizsgáló kísérletek összevont lép inváziós eredményei. A grafikon a pozitív szerv minták arányát mutatja az összes (2x6 csibe/időpont/csoport) vizsgálthoz képest. (Csoportnevek feloldása lásd: 21. ábra aláírás, részletes kísérleti elrendezés: XIII. táblázat.)

A máj és lép pozitivitás tekintetében a védelem a 3. és 4. hétig kimutatható volt, azzal a különbséggel, hogy a 3-4. héten a lépben nem csak a challenge törzs, hanem mindkét vakcina törzs is jóval magasabb százalékban fordult elő mint a májban (22., 23. ábra). Az immunizált csoportokban a challenge törzs mindvégig lényegesen alacsonyabb titerben volt jelen, mint a Challenge kontrollban.



24. ábra A korai védőhatást vizsgáló kísérletek összevont kloáka tampon eredményei. A grafikon a pozitív minták arányát mutatja az összes (2x6 csibe/időpont/csoport) vizsgálthoz képest. (Csoportnevek feloldása lásd: 21. ábra aláírás, részletes kísérleti elrendezés: XIII. táblázat.)

A védőképesség mindkét vakcinázást illetően ugyancsak mindvégig jelentős volt a kloáka tamponok alapján is (24. ábra). Míg a Principális csoportokban a harmadik hét után már nem lehetett challenge törzset visszaizolálni, addig a baktériumokkal végzett egyedi fertőzések adatai azt mutatták, hogy mindhárom törzs (Challenge kontroll és két különböző Vakcina kontroll) meglehetősen gyakorisággal ürült a 4. héten is (24. ábra).

Az eredmények statisztikai értékelését a XVIII. táblázat mutatja. A táblázatban nem szereplő csoportpárok esetében a szignifikancia szintje minden esetben: $P < 0,05$.

XVI. táblázat A korai védelmet vizsgáló 1. kísérlet eredményei.

A táblázat az átlagos vakbél titereket (6 csibe/csoport) és a szerv inváziós adatokat (*Salmonella* pozitív/vizsgált szerv) mutatja. (Csoportnevek feloldása lásd: 21. ábra aláírás, részletes kísérleti elrendezés: XIII. táblázat.)

		1. Vakcina kontroll 1	2. Principális 1	3. Challenge kontroll	4. Principális 2	5. Vakcina kontroll 2
1. hét	Vakbél-titer(log₁₀)	8,77	5,25	8,34	5,60	7,85
	Kloáka tamp.	6/6	3/6	6/6	2/6	6/6
	Lép	6/6	0/6	6/6	4/6	6/6
	Máj	6/6	0/6	6/6	4/6	6/6
2. hét	Vakbél-titer	5,63	<3,0	5,82	<3,59	5,25
	Kloáka tamp.	6/6	0/6	2/6	2/6	6/6
	Lép	6/6	2/6	6/6	5/6	6/6
	Máj	5/6	0/6	6/6	2/6	5/6
3. hét	Vakbél-titer	4,20	<3,0	4,12	<3,0	3,68
	Kloáka tamp.	5/6	0/6	4/6	0/6	6/6
	Lép	4/6	0/6	5/6	0/6	6/6
	Máj	0/6	0/6	5/6	0/6	0/6
4. hét	Vakbél-titer	<3,62	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
	Kloáka tamp.	4/6	0/6	2/6	0/6	4/6
	Lép	4/6	0/6	5/6	2/6	1/6
	Máj	0/6	0/6	2/6	0/6	0/6

XVII. táblázat A korai védelmet vizsgáló 2. kísérlet eredményei.

A vakbél átlag titerék (6 csibe/csoport) és az inváziós adatok mellett (*Salmonella* pozitív/vizsgált szerv) a szervek átlagos *Salmonella* titerét is feltüntettük (6 csibe/csoport). (Csoportnevek feloldása lásd: 21. ábra aláírás, részletes kísérleti elrendezés: XIII. táblázat.)

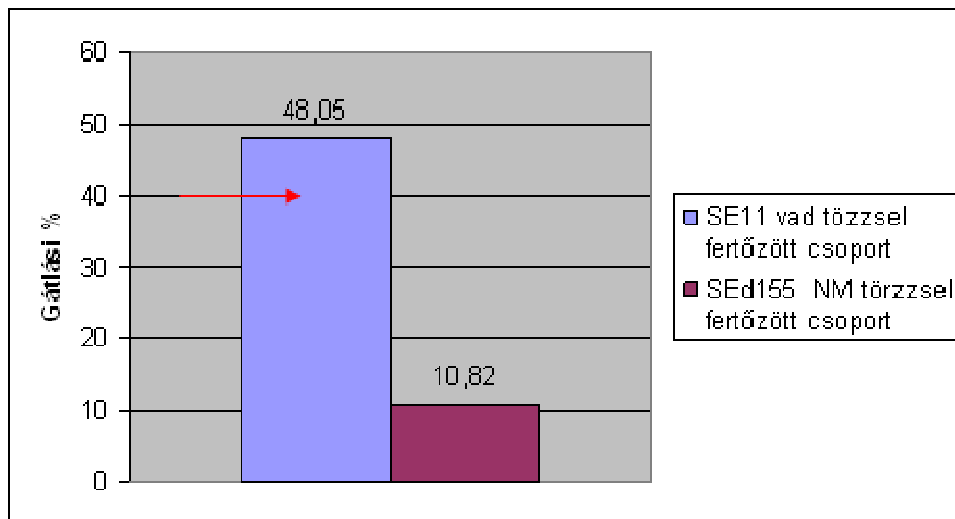
		1. Vakcina kontroll 1	2. Principális 1	3. Challenge kontroll	4. Principális 2	5. Vakcina kontroll 2
1. hét	Vakbél titer (log₁₀)	6,64	<3,0	6,23	<4,60	6,32
	Kloáka tamp.	6/6	0/6	6/6	1/6	6/6
	Lép	6/6 4,72	0/6 <2,69	6/6 4,16	2/6 <4,19	6/6 <3,77
	Máj	6/6 3,63	0/6 <2,69	6/6 3,98	1/6 <2,69	6/6 <2,69
2. hét	Vakbél titer	5,98	<3,0	6,75	<3,0	4,40
	Kloáka tamp.	6/6	0/6	6/6	0/6	6/6
	Lép	6/6 3,87	0/6 <2,69	6/6 4,35	0/6 <2,69	6/6 <2,92
	Máj	6/6 2,85	0/6 <2,69	6/6 3,57	2/6 <2,69	4/6 <3,00
3. hét	Vakbél titer	4,89	<3,0	4,35	<3,0	<3,12
	Kloáka tamp.	5/6	0/6	5/6	0/6	2/6
	Lép	6/6 3,87	1/6 <2,69	6/6 3,14	0/6 <2,69	3/6 <2,69
	Máj	3/6 2,85	0/6 <2,69	6/6 2,69	0/6 <2,69	1/6 <2,39
4. hét	Vakbél titer	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0
	Kloáka tamp.	5/6	0/6	3/6	0/6	0/6
	Lép	2/6 <2,39	0/6 <2,69	4/6 <2,39	1/6 <2,69	2/6 <2,39
	Máj	1/6 <2,39	0/6 <2,69	2/6 <2,39	0/6 <2,69	1/6 <2,39

XVIII. táblázat A korai védelmet vizsgáló 1-2. kísérlet statisztikai értékelése.

A táblázat adatai a fejlécben szereplő csoportok eredményeinek páronkénti összevetését mutatja heti és szervenkénti bontásban. A táblázat celláiban szereplő első érték a szignifikancia szint %-ban (P-érték), a második (zárójeles) adat pedig a két csoport átlagának különbsége. N.É.: nem értékelhető. A táblázatban nem szereplő csoportpárok esetében (pl. Principális 1 – Vakcina Kontroll 1, stb.) a szignifikancia szintje minden értékelhető esetben: $P < 0,05$. (Csoportnevek feloldása lásd: 21. ábra aláírás, részletes kísérleti elrendezés: XIII. táblázat.)

		Principális 1- Principális 2	Vakcina K.1 - Vakcina K.2	Vakcina K.1 - Challenge K.	Vakcina K.2 - Challenge K.
		Szignifikancia% (különbség)	Szignifikancia% (különbség)	Szignifikancia% (különbség)	Szignifikancia% (különbség)
1. hét	Vakbélítiter1. kísérlet	43,5 (-0,35)	1,81 (0,93)	32,5 (0,38)	15 (-0,55)
	Vakbélítiter2. kísérlet	N.É.	55,1 (0,32)	45,7 (0,4)	88 (0,08)
	Lép	N.É.	0,03 (0,94)	9,84 (0,38)	2,26 (-0,56)
	Máj	N.É.	1,52 (0,77)	5,42 (-0,53)	0,02 (-1,3)
2. hét	Vakbélítiter1.	0 (-4,31)	32,5 (-0,38)	60,3 (-0,20)	13 (-0,58)
	Vakbélítiter2.	N.É.	0,64 (1,54)	15,8 (-0,77)	0,02 (-2,34)
	Lép	N.É.	0,02 (0,96)	4,3 (-0,47)	0 (-1,43)
	Máj	N.É.	70,3 (-0,15)	1,52 (-0,77)	10,6 (-0,62)
3. hét	Vakbélítiter1.	N.É.	19,2 (0,53)	94 (0,03)	23 (-0,5)
	Vakbélítiter2.	N.É.	32,6 (0,67)	33,1 (0,55)	85,5 (-0,12)
	Lép	N.É.	50,7 (-0,3)	0,31 (-0,9)	16,6 (-0,6)
	Máj	N.É.	0 (2,98)	60,3 (0,29)	0,04 (-2,69)
4. hét	Vakbélítiter1.	N.É.	0 (3,63)	0 (3,63)	N.É.
	Vakbélítiter2.	N.É.	N.É.	N.É.	N.É.
	Lép	N.É.	N.É.	N.É.	N.É.
	Máj	N.É.	N.É.	N.É.	N.É.

Végül szeretnénk volna megbizonyosodni arról is, hogy a flagellin és virulencia plazmid mentes SE Δ 155 mutáns és a vad típusú SE11 által a negyedik kísérleti hét végére kiváltott szerológiai válasz valóban eltérő. Ennek bizonyítására a Diagnosticum Rt segítségével *S. Enteritidis* flagellin specifikus ellenanyaggal blokkoló szendvics ELISA vizsgálatot végeztünk (25. ábra).



25. ábra A flagellin specifikus ellenanyag kimutatása DAS ELISA segítségével. A diagram az állatok savójában jelenlévő flagellin specifikus ellenanyagok által okozott gátlás százalékát mutatják. (A nyíl jelzi a pozitívhatárát.)

A vad törzssel fertőzött csoportban a két kísérlet során megvizsgált 20 állat közül 12 (60%) haladta meg a DAS ELISA-val pozitívnak tekintett 40%-os gátlást, míg a flagellin mentes mutáns esetében nem találtunk pozitívhatárát túllépő mintát (0%).

5.4. Megbeszélés

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.

In vitro elsőként Vero sejteken, majd csirke embrió fibroblaszt (CEF) sejteken is vizsgáltuk a mutánsaink sejt inváziós képességét, abban a reményben, hogy az így nyert adatok előzetes becslésre adnak lehetőséget a későbbi *in vivo* inváziós képességekre vonatkozóan. Az inváziós kontroll törzseket úgy próbáltuk kiválasztani, hogy megfelelő viszonyítási alapot jelentsenek mind a szülői *S. Enteritidis* 11, mind a (reményeink szerint attenuált) mutáns származékai számára. Ezért a kontrollok között szerepelt a korábbiakban Vero sejt kultúrán invázióknak bizonyult *S. Typhimurium* F98 törzs (Barrow és mtsai., 1989), valamint a *S. Enteritidis* törzsek között baromfira invázió *S. Enteritidis* 147 jelű törzs (Methner és mtsai., 1995).

Eredményeink alapján azonos tendencia figyelhető meg a Vero és a CEF invázió esetében. Mindkét eredmény sor szerint a szülői SE11 magas (az invázió kontroll törzsekhez hasonló) inváziós értékeket mutatott, míg a nem mozgó (SE2102) valamint a nem mozgó és plazmid mentes (SE Δ 77, SE Δ 155) mutánsok egyaránt non-invázióknak bizonyultak. A nem mozgó és annak plazmid mentes változatai között nem volt lényeges invázióbeli eltérés. A plazmid mentes és motilis SE11 vizsgálatától e sorozatban el kellett tekintenünk, így nem jelenthető ki egyértelműen, hogy a sejtinvázió csökkenését egyedül a flagella hiánya okozta, de eredményeink, és korábbi vizsgálatok is ezt a hipotézist látszanak igazolni. Jones és munkatársai (1981) *S. Typhimurium* esetében figyelték meg, hogy a motilis fenotípus előnyösen befolyásolja a HeLa sejtekkel való kapcsolódást, *S. Enteritidis* en pedig van Asten és munkatársai (2000) állapították meg, hogy a flagellin gén inaktivációja jelentősen csökkentette a mutáns Caco-2 sejtekbe való invázióját. Az általunk is használt Vero sejteken pedig *S. Typhimurium* és *S. Infantis* szerovariánsok nem mozgó törzsei voltak sokkal kevésbé invázióknak, mint motilis társaik, ugyanakkor a virulencia plazmid mentes *S. Typhimurium* és *S. Gallinarum* törzsek inváziós képességei nem csökkentek számottevően (Barrow és Lowell 1989).

Mutáns törzseink interleukin-8 stimuláló hatása, hasonlóan az inváziós képességekhez jelentősen elmaradt mind a szülő törzs SE11, mind a külső kontroll *S. Enteritidis* 147

indukálta értékektől. A SE2102 és a SEΔ155 között ebben a tekintetben sem figyelhettünk meg jelentős különbséget.

Mivel az IL-8 indukáló hatás szoros összefüggésben áll az adott baktérium inváziós képességeivel (Eckmann és mtsai., 1993) – minél invázívabb egy baktérium, annál erősebb az IL-8 stimuláló hatása az epitheliális sejtekre nézve – ezért feltételezhetően az IL-8 indukció csökkenésének hátterében is elsősorban a flagella termelés hiánya áll, míg a plazmid-mentesség csupán másodlagos szerepet játszhat. Az IL-8 az egyik legfontosabb kemotaktikus faktor, amely elősegíti az effektor immunsejtek (granulociták, makrofágok) fertőzés helyére való áramlását, ezzel kulcsszerepet játszik a lokális fertőzés felszámolásában.

A biztató sejt inváziós kísérletek folytatásaként, amelyekben már a flagella hiányos SE2102 mutáns is csökkent inváziós értékeket mutatott, *in vivo* körülmények között is teszteltük a vakcina jelölt törzseket. Az állatkísérletek során orálisan fertőzött SPF naposcsibéket használtunk, melyek éretlen bélflórájuknak és immunrendszerüknek köszönhetően igen fogékonyak a *Salmonella* fertőzésekre.

Az *in vivo* előkísérletek kezdeti fázisában az elsőként előállított non-motil mutánsok kerültek tesztelésre szerv invázió és vakbél kolonizáció tekintetében (XIV. táblázat), majd a második kísérletsorozatban a SE2102 flagella mentes mutáns plazmidüzött változatait vizsgáltuk ugyanígy (XV. táblázat).

Érdekes, hogy a vizsgálatba vont non-motil mutánsok bár genetikai értelemben azonosak voltak, hiszen a korábbi szekvencia adatok alapján ugyanabban a *fliD* flagelláris génben, ugyanabban a pozícióban hordozták az inszerciót, a szerv inváziós értékeik mégis nagy eltéréseket mutattak (XIV. táblázat). A lép invázió értéke ezekben a kísérletekben szinte mindig meghaladta a máj invázió értékeit, mely arra utal, hogy a makrofágok és granulociták szalmonellákkal terhelt sejtjeit a lép nagyobb hatékonysággal gyűjti be.

Összességében elmondható, hogy a nem mozgó mutánsok *in vivo* szervinváziós képessége nem csökkent olyan jelentősen, mint azt az *in vitro* sejtinváziós kísérletek után vártuk volna. Magyarázatul szolgálhat erre, hogy a naposcsibe sokkal komplexebb rendszert jelent az *in vitro* sejt kultúrákhoz képest (Baumler és mtsai., 2000). Ennek példáját láttuk a *S. Hadar* (és *S. Typhimurium*) törzsek quorum sensing növekedésgátló hatásának vizsgálata kapcsán is (Nógrády és mtsai., 2003a, 2003b).

A plazmid mentes mutánsokon végzett inváziós-kolonizációs vizsgálatok sokkal kiegyensúlyozottabb eredményeket hoztak, mint a korábbiak. Ebben szerepe lehetett az idevágó kísérletekben használt „laboratóriumi” minőségű SPF White Leghorn

naposcsibéknek (CEVA), melyek feltehetően egységesebb genetikájú populációt képviseltek, mint a Ross hibrid csibék.

Szintén érdekesen alakult a mutánsok által az előkísérletek során elért vakbél-titer: a flagellin mentes mutánsok mindegyike magasabb csíraszámot ért el a vakbélben, mint a szülői törzs. A jelenségre magyarázatul szolgálhat, hogy a flagellin mentes törzsek könnyebben elkerülhetik a bél-immunitás védekező folyamatait (TLR5, granulociták, makrofágok), és az is lehet, hogy a flagellin termelés hiányában a baktériumok nagyobb hatékonysággal tudnak egyéb, a kolonizációban fontos szerepet játszó felületi fehérjéket termelni.

A következő, White Leghorn csibéken végzett vizsgálatok során a vakbélben mért csíraszámok a szülői törzs és a mutánsok esetében nagyjából egyformák voltak, mely értékek megerősítik, hogy a naposcsibék bélbeni kolonizációját az elvégzett mutációk lényegében nem csökkentették. Nem szabad azonban figyelmen kívül hagyni azt, hogy az egyéni fogékonyságbeli különbségek alacsony állat létszám mellett a vakbél-titer és szerv inváziós értékekre is jelentős befolyással lehetnek.

Véleményünk szerint a vakcina jelölt törzsek kezdeti magas bél-titer értéke a védőhatás szempontjából előnyös tulajdonságokat jelez, hiszen a vakcina törzsek bélben való sikeres megtelepedése az eredményes immunizálás egyik fontos feltétele. A vakcina törzs korai sikeres kolonizációja megakadályozhatja továbbá a vad törzsek megtelepedését és így a fertőzés kialakulását (kompetitív kizárás, quorum sensing). Ebben a tekintetben nem kerülhette el figyelmünket az a tény, hogy az ún. „gold standard” –nak tekintett élő, attenuált *S. Typhimurium* Zoosaloral H vakcina törzs kolonizációs képessége jóval a SE11-es szülő törzs és mutánsainak értékei alatt maradt.

A szerv invázió csökkenése tekintetében nehezebb ilyen egyértelmű célt megfogalmazni, mert ugyan nyilvánvaló az összefüggés a szervinvázió és a megbetegítő képesség között, de az inváziós képesség túlzott csökkentése esetleg túlzottan gyengítheti a vakcina törzs által kiváltott immunitást is. E tekintetben minden bizonnyal további pontosító vizsgálatokra lenne szükség, hiszen az irodalomban nem találtunk adatot arra, hogy a „vakcina” illetve a „vad” törzsek esetleges azonos csíraszám ellenére milyen kórtani elváltozások lehetnek akár a lépben, akár a májban az egyes virulencia faktorok hiányának függvényében.

A korai védelemre és a hosszabb távon mért ártalmatlanságra irányuló kísérleteink eredményéből levonható az a következtetés, hogy az általunk alkalmazott modell (bábolnai Ross napos csibe modell) a korai védelem mérésére alkalmas: a vakbél, máj, lép és kloáka

minták challenge *Salmonella* tartalma és a fertőzöttség gyakorisága alapján mindkét "vakcina" törzs (SE11, SEΔ155) megfelelő korai védelmet nyújtó képessége bizonyítható. Természetesen - mint a többi, kísérleti és piacon lévő vakcina esetében – a védelem nem 100%-os. Ezen túl megállapítható, hogy az SE11 szülő törzs a SEΔ155-ös nem mozgó, virulencia plazmid mentes mutánsához képest kifejezettebb védőhatást tanúsított. Ami többek között azzal is magyarázható, hogy a mutánsnak a szülőhöz képest kisebb hatékonysággal működő „quorum sensing” típusú gátló hatása lehetett (Nógrády és mtsai, 2003a, 2003b). Ennek alapján – természetesen – nem gondolnánk, hogy ezen „vad” izolátumot ajánljuk *S. Enteritidis* elleni vakcinázásra, hiszen erre sem a marker hiányában, sem a virulencia plazmid jelenlétében nem érdemes gondolni.

A további munkánk során az itt megszerzett ismereteket hasznosítva igyekszünk majd – ezen SE11-es vagy más *S. Enteritidis* törzsen – olyan módosítást végrehajtani, mely a védőképességet megfelelő szintre hozza. Ami az ártalmatlansági tulajdonságokat illeti, ezen adatokat annak fényében kell megítélnünk, amelyeket egyéb, jól bevált vakcina törzsekről eddig megismerhettünk. Az ilyen adatok (XIV. táblázat, Nagy, 1999) azt jelzik, hogy a vakcina törzsek ártalmatlanságát nem a szervezetben való kimutathatóságuk, hanem esetleges elhullást okozó képességük (illetve annak hiánya) alapján ítéljük meg. Esetünkben elhullás egyik vakcinázott csoportban sem volt, viszont a súlygyarapodási különbségek egyértelműen mutatták, hogy a challenge törzshöz képest a SE11 törzs is jóval kedvezőbb egészségi állapotot jelzett, a mutáns vakcina kontroll pedig még ennél is jobb adatokat mutatott. (Az testsúly eredmények nem szerepelnek a dolgozatban.)

Összességében elmondható, hogy a vakcinaként kipróbált SE11 szülő törzs és annak nem mozgó, virulencia plazmid mentes SEΔ155 jelű mutánsa az alkalmazott 10^8 CFU/csibe dózisban biztonságosan használható naposcsibék száján át való fertőzésére és mindkettő jelentős korai, rövid távú védettséget biztosít *Salmonella* Enteritidis ellen.

Záró megbeszélés

Mint az irodalmi bevezetőben ismertettük, az élelmiszerek által közvetített bakteriális megbetegedések sorában Magyarországon és számos más európai országban az első helyen a szalmonellózis áll, bár néhány országban a legutóbbi években a *Campylobacter* fertőzés vált gyakoribbá. Mindkét kórokozó tekintetében jelenleg a baromfi eredetű termékeket tartjuk elsődleges élelmiszer fertőzési forrásnak. A szalmonellózisok gyakoriságában Magyarországon 1996-tól kezdve állt be jelentős és – a legutóbbi évig – tartós csökkenés (Epinfo 2006), mely jól egybeesett a *Salmonella* elleni vakcinázások 1994-ben elkezdett hazai bevezetésével és rohamos elterjedésével. Tekintettel arra, hogy a hazai humán fertőzöttség jelenlegi szintje (kb 80-100 eset/100 000 lakos) még mindig jóval fölötte van az európai átlagnak, érdemes áttekinteni a vakcinás védekezésben rejlő lehetőségeket és a terület kutatási feladatait szem előtt tartani, annak előrebocsátásával, hogy a legjobb vakcina is csak legfeljebb egy lehet a *Salmonella* elleni védekezés eszköztárában.

A vakcinázást egyébként csak az utóbbi években soroljuk az állatok szalmonellozisa elleni védekezés mindennapos gyakorlatban alkalmazható lehetőségei közé. Az örvendetes előrehaladás oka többek között a *Salmonella* virulencia faktorokról, azoknak a kórfejlődésben játszott szerepéről és a bél-immunitás kialakulásának részleteiről szerzett ismereteink bővülése, továbbá az az igény, mely elsősorban a tömeges baromfi hús és tojástermelés körülményei között kívánja a *Salmonella* fertőzöttséget visszaszorítani. Mint a bevezetőben is rámutatunk, a rendelkezésre álló irodalmi és gyakorlati tapasztalatok azt mutatják, hogy ennek az igénynek a kutatók és a vakcina gyártók alapján véve jól megfeleltek. Az egyes állatfajoknál - különösen baromfinál - a paratífuszt okozó *Salmonella* serovarok elleni vakcinás védekezés napjainkra „polgárjogot” kapott. A baromfi és néhány más állatfaj esetében ugyanis az emberre vonatkozó ételfertőzési veszély - különösen az iparszerű tömeges tartás és feldolgozás miatt - oly mértékben megnövekedett, hogy a korábbi orvosi szemlélet által helytelennek ítélt immunizálási eljárásokat (inaktivált és/vagy élő-attenuált baktériumokkal) is fontolóra kellett venni. E célból ma már több elölt, parenterálisan alkalmazandó (I. generációs) ill. élő attenuált, orálisan alkalmazandó (II. generációs) vakcina van forgalomban, melyek a *S. Enteritidis* ill. *S. Typhimurium* elleni specifikus védelmet szolgáltatják. Az élő, attenuált, orálisan alkalmazandó vakcina törzsek kétségtelenül

hatékonyabb helyi és általános immunitást nyújtanak, azonban az attenuáció (virulencia csökkenés) mértéke a hatékonysággal fordított arányban van s ezért igen nehéz olyan *Salmonella* törzset előállítani, melynek alkalmazása kellően hatékony, de ugyanakkor teljes mértékben aggálytalan legyen.

További nehézséget jelent az, hogy az egyes szerocsoportokat képviselő vakcina törzsek a többi szerocsoport ellen legfeljebb csak rövid ideig tartó immunitást nyújtanak. A tartósabb védelem – ismételt vakcinázás esetén is – többnyire csak a homológ szerocsoportra vonatkozik. Például a *S. Typhimurium* és *S. Enteritidis* élő orális vakcinázások által előidézett keresztvédelemre vonatkozóan témacsoportunk is végezett immunizálási és ráfertőzési kísérleteket, melyek alapján ismételt immunizálásokat követő 10 napon belül mind a kísérleti *S. Enteritidis* (*aroA*⁻) vakcina törzs mind a Zoosaloral-H vakcina törzs a *S. Enteritidis* challenge (vad virulens törzs) ellen kielégítő védettséget adott. A Zoosaloral H vakcinatörzs azonban homológ rendszerben erősebb védelmet adott (Nagy, 1999). A *S. Typhimurium* vakcinának a *S. Enteritidis* elleni csökkentebb védőértékét tapasztalva, egyre többen foglalkoznak *S. Enteritidis* élő orális vakcinák előállításával is, melyek közül – mint korábban említettem – egyesek már több országban is forgalomban vannak, mások még fejlesztés ill. engedélyeztetés alatt állnak.

Az ilyen vakcina törzsek azonban a gazda szervezetet rendszerint a vad törzsektől megkülönböztethetetlen módon hangolják át, s így a vakcinázás a természetes fertőzöttségtől szerológiai módszerekkel nem vagy kevésbé megkülönböztethető (II. generációs vakcinák). Legutóbb viszont felmerült az igény olyan, célzott genetikai beavatkozásokkal előállítandó élő vakcinákra, melyek a vad törzsektől elkülöníthető szerológiai választ produkálnak (immunológiai markerük van), ugyanakkor a szervezet védekező képességét a lehető legcélszerűbb időben és módon fokozzák. Mindezen feltételeknek csakis a célzott genetikai változtatások révén előállított vakcina törzsek felelhetnek meg (III. generációs vakcinák).

Ahhoz, hogy a fenti elvárásoknak megfelelő, sikeres vakcinákat dolgozzunk ki, előbb ismerni kell a kórokozónak a szervezeten belüli viselkedését, s annak genetikai alapjait. Ezeket természetesen eddig is számos külföldi csoport vizsgálta, elsősorban egérben, de a napos csibére vonatkozóan kevés pathogenetikai adattal rendelkezünk. Ezért ilyen irányú – ezen disszertációban nem részletezett - kísérletekben a baromfiban előforduló szerotípusok közül az emberre legveszélyesebb *Salmonella* Enteritidis fertőzés különböző fázisait naposcsibék

kísérleti fertőzése kapcsán kísértük figyelemmel. A fertőződés utáni első fontos lépés a szalmonelláknak a bélhámsejtekhez – azok mikrobolyhaihoz - való kötődése az adhézió, melynek a *Salmonella* Enteritidis esetében egy ún. SE14-es fimbria az egyik legmeghatározóbb eszköze, de egyes adatok szerint a csilló antigének (flagellinek) is szerephez jutnak. Ezt követően a *Salmonella* a sejtmembránnal lép közvetlen kapcsolatba, s az inváziót előkészítő fehérjéket az SPI-1 által kódolt III. típusú szekréción rendszerének révén, (ún. molekuláris fecskendők segítségével) juttatja a célsejtekbe. Ezt követi a *Salmonella* bekebelezése, mely legintenzívebb és legsikeresebb a bél nyiroktüszőit fedő, ún. M (microfold)-sejtjei és a makrofágok által, mely utóbbiak segítségével a szalmonellák eljutnak a távolabbi szervekbe (lépbe, májba, petefészekbe), s ott megtelepedve fejtik ki további kórokozó hatásukat. Mint az eddigiekből kiderült, a *Salmonella* elleni védekezés egyik hatékony eszköze a napos-kori, szájon át történő immunizálás, hiszen így a bélben megtelepedett vakcina törzs a természetes fertőzéshez hasonlóan tudja áthangolni a nyálkahártyát. Fontos tehát, hogy vakcina törzsek a bélben jól meg tudjanak telepedni, de gyengített inváziós képességgel rendelkezzenek, továbbá, hogy a vad törzsektől szerológiailag is jól elkülöníthetők (markerrel rendelkezők) legyenek

A fentiekből következően kutatásainkat a *Salmonella* Enteritidis elleni korai bél-immunitás kifejlesztésére irányítottuk, remélve, hogy így a naposcsibék legfogékonyabb korában nyújtunk védelmet, s ezáltal az emberre nézve legveszélyesebb szerotípus okozta baromfi hús és tojás szennyeződést is megelőzhetjük.

Ezért a disszertációban tárgyalt kísérletek során arra törekedtünk, hogy – a már kereskedelmi forgalomban lévő vakcinák mellett – olyan további potenciális vakcina jelöltként szóba jöhető törzseket állítsunk elő, melyek a fenti követelményeknek megfelelnek, vagyis szerológiai megkülönböztetésre alkalmas markerrel rendelkeznek, s a bélben egy időre megtelepedve, ott hatékony immunitást váltsanak ki, ugyanakkor virulenciájukban megfelelően gyengítettek legyenek. Erre a célra kézenfekvőnek látszott a *S. Enteritidis* törzsek csillóinak (flagelláinak) „bénítása”, melyhez viszont előbb meg kellett ismernünk a *Salmonella* flagellin gén rendszer PCR-es feltérképezésének lehetőségeit. 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 koncentrálna. 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 gének közvetlen környezetében okozva mutációkat azok működését blokkolja. 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 (3.3. fejezet). A munka további tudományos érdekességének tekintjük a részlegesen mozgó (*yjjY*) mutánsokra vonatkozó megfigyeléseket is, melynek részletes kifejtését illetően ugyancsak a 3. fejezetre utalunk.

Jelen munka szempontjából a továbbhaladást arra tudtuk építeni, hogy, az előállított és majdani *in vitro* és *in vivo* vizsgálatra kijelölt „flagella bénított” mutánsok stabilan mozgásképtelenek (non-motilisak) lettek, a flagella termelés hiánya pedig egy potenciális vakcina törzs negatív-markere lehet.

A következő feladat a már markerezett, nem-mozgó *S. Enteritidis* törzsek virulenciájának további csökkentése volt. A feladatot a *Salmonella* virulencia plazmid kiűzésével kívántuk megoldani, melyre egy IS10-IS30 kombinált transzpozíciós rendszert alkalmaztunk. Ennek során a reaktív (IS30)₂ 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. Ezzel a teljes plazmidot elveszített, illetve csonkolt virulencia plazmiddal rendelkező, deléciós változatokat állítottunk elő.

Ezek után felmerült a kérdés, hogy az elvégzett genetikai változtatások (flagellin bénítás és plazmid úzés), milyen változásokat hoztak létre a vakcina jelölt törzsek virulenciájában (bélbeni megtelepedés képességében és a szervi invázióban). A kérdés megválaszolása céljából SPF minőségű napos csibéket fertőztünk, s azt tapasztaltuk, hogy a vakcina-jelölt mutánsok szerv-inváziós készsége dózistól függő volt, de a szülőhöz képest jelentősen csökkent, míg a bél kolonizációs képesség tekintetében 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.

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.

Kísérleteink további célja volt, hogy az így előállított *S. Enteritidis* mutánsoknak a vad virulens *S. Enteritidis* törzsekkel szembeni korai védelmet nyújtó képességét, valamint ürülésüket és ártalmatlanságukat (tovább is) vizsgáljuk. Az elvégzett két kísérlet adatai összességében azt jelzik, hogy a vakcina jelölt törzsek megfelelő szintű korai védelmet adtak. Természetesen a vad szülői törzs védőhatása kifejezettebb volt, de nem sokkal maradt el a nem mozgó, virulencia plazmid mentes mutáns sem. Ez jelzi, hogy a módszer jó, és alkalmazható további, vakcina jelölt törzsek előállítására is.

Konklúziók

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 H2 fázisért felelős *fljB* gén, a flagellin represszor *fljA* gén, valamint a teljes fázisváltó rendszer (*hin*, *hixL*, *hixR*). Jelen van azonban a *fliC* és annak operátor szekvenciája, amelyek folyamatosan expresszálják a H1-es flagellint.

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 lényege, hogy az IS30 transzpozáz jelenlétében igen aktív, összekapcsolódott IS30 IR végeket a kiűzni kívánt plazmidra juttatjuk, amely aztán az IS30 transzpozáz hatására olyan genetikai átrendeződések kiindulópontjává válik, amelyek igen nagy gyakorisággal vezetnek a replikon eliminációjához. A módszer *Salmonella* Enteritidisben 50% feletti virulencia plazmid üzési gyakorisággal működött. A leírt módszer előnye, hogy jó hatékonysága mellett deléciós plazmid változatok generálására (így deléciós térképezésre) is alkalmas lehet, továbbá – mint egyébutt közöltük - más baktériumfajokban (*Escherichia coliban*) is működik.

Az előállított nem mozgó (SE2102) valamint a „virulencia plazmid mentes, nem mozgó” (SE Δ 155) *Salmonella* Enteritidis 11 származékok virulencia tulajdonságait *in vitro* Vero és CEF sejteken, valamint *in vivo*, naposcsibe modellen vizsgáltuk. A szülő törzshöz képest mind a SE2102, mind a SE Δ 155 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.

Irodalomjegyzék

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990 215:403-10.

Babu U, Scott M, Myers MJ, Okamura M, Gaines D, Yancy HF, Lillehoj H, Heckert RA, Raybourne RB. Effects of live attenuated and killed *Salmonella* vaccine on T-lymphocyte mediated immunity in laying hens. *Vet Immunol Immunopathol.* 2003 Jan 10;91(1):39-44.

Barrow PA and Wallis TS. 2000. Vaccination against *Salmonella* infections in food animals: rationale, theoretical basis and practical application. In: *Salmonella in domestic animals*. Eds.: Wray A. and Wray C. CAB International, Oxford, England, p. 323-339.

Barrow PA, Hassan JO, Lovell MA, Berchieri A. Vaccination of chickens with *aroA* and other mutants of *Salmonella* typhimurium and *S. enteritidis*. *Res Microbiol.* 1990 Sep-Oct;141(7-8):851-3.

Barrow PA, Lovell MA. Invasion of Vero cells by *Salmonella* species. *J Med Microbiol.* 1989 Jan;28(1):59-67.

Barrow PA, Tucker JF, Simpson JM. Inhibition of colonization of the chicken alimentary tract with *Salmonella* typhimurium gram-negative facultatively anaerobic bacteria. *Epidemiol Infect.* 1987 Jun;98(3):311-22.

Barrow PA. 1991. Immunological control of *Salmonella* in poultry. In: *Colonization control of human bacterial enteropathogens in poultry*. Ed.: Blankenship L.C. Academic Press, San Diego, USA, p. 199-217.

Barrow PA. 1999. Virulence of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. In: *Salmonella enterica serovar Enteritidis in humans and animals* Ed.: Saeed, A.M. Iowa State University Press, Ames, USA, 95, 14054-14059.

Barrow PA. The paratyphoid salmonellae. Rev Sci Tech. 2000 Aug;19(2):351-75.

Baumler AJ, Tsois RM, Bowe FA, Kusters JG, Hoffmann S, Heffron F. The *pef* fimbrial operon of *Salmonella typhimurium* mediates adhesion to murine small intestine and is necessary for fluid accumulation in the infant mouse. Infect Immun. 1996 Jan;64(1):61-8.

Baumler, A.J., Tsois, R.M. and Heffron, F. 2000. Virulence mechanisms of *Salmonella* and their genetic basis In: *Salmonella in domestic animals*. Eds.: Wray A. and Wray C. CAB International, Oxford, England, 323-339.

Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. 1979 Nov 24;7(6):1513-23.

Brenner FW, Villar RG, Angulo FJ, Tauxe R, Swaminathan B. *Salmonella* nomenclature. J Clin Microbiol. 2000 Jul;38(7):2465-7

Buchmeier NA, Heffron F. Inhibition of macrophage phagosome-lysosome fusion by *Salmonella typhimurium*. Infect Immun. 1991 Jul;59(7):2232-8.

Casadesus J, Naas T, Garzon A, Arini A, Torreblanca J, Arber W. Lack of hotspot targets: a constraint for IS30 transposition in *Salmonella*. Gene. 1999 Sep 30;238(1):231-9.

Caspers P, Dalrymple B, Iida S, Arber W. IS30, a new insertion sequence of *Escherichia coli* K12. Mol Gen Genet. 1984;196(1):68-73.

Chen LM, Hobbie S, Galan JE. Requirement of CDC42 for *Salmonella*-induced cytoskeletal and nuclear responses. Science. 1996 Dec 20;274(5295):2115-8.

Chu C, Hong SF, Tsai C, Lin WS, Liu TP, Ou JT. Comparative physical and genetic maps of the virulence plasmids of *Salmonella enterica* serovars typhimurium, enteritidis, choleraesuis, and dublin. Infect Immun. 1999 May;67(5):2611-4.

Cooper GL, Nicholas RA, Cullen GA, Hormaeche CE. Vaccination of chickens with a *Salmonella enteritidis aroA* live oral *Salmonella* vaccine. *Microb Pathog.* 1990 Oct;9(4):255-65.

Cooper GL, Venables LM, Nicholas RA, Cullen GA, Hormaeche CE. Vaccination of chickens with chicken-derived *Salmonella enteritidis* phage type 4 *aroA* live oral *Salmonella* vaccines. *Vaccine.* 1992 10(4):247-54.

Cooper GL, Venables LM, Woodward MJ, Hormaeche CE. Invasiveness and persistence of *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, and a genetically defined *S. enteritidis aroA* strain in young chickens. *Infect Immun.* 1994 Nov;62(11):4739-46.

Cooper GL, Venables LM, Woodward MJ, Hormaeche CE. Vaccination of chickens with strain CVL30, a genetically defined *Salmonella enteritidis aroA* live oral vaccine candidate. *Infect Immun.* 1994 Nov;62(11):4747-54.

Craig NL. The mechanism of conservative site-specific recombination. *Annu Rev Genet.* 1988;22:77-105.

Cramer R, Davies JE, Hutter R. Plasmid curing and generation of mutations induced with ethidium bromide in streptomycetes. *J Gen Microbiol.* 1986 Mar;132(3):819-24.

Crosa JH, Brenner DJ, Ewing WH, Falkow S. Molecular relationships among the *Salmonelleae*. *J Bacteriol.* 1973 Jul;115(1):307-15.

Curtiss R 3rd, Kelly SM. *Salmonella typhimurium* deletion mutants lacking adenylate cyclase and cyclic AMP receptor protein are avirulent and immunogenic. *Infect Immun.* 1987 Dec;55(12):3035-43.

Czirók É. 1999. Klinikai és járványügyi bakteriológia, Budapest, Melania kiadó

Dalrymple B, Caspers P, Arber W. Nucleotide sequence of the prokaryotic mobile genetic element IS30. *EMBO J.* 1984 Sep;3(9):2145-9.

Desmidt M, Ducatelle R, Haesebrouck F. Pathogenesis of *Salmonella* enteritidis phage type four after experimental infection of young chickens. *Vet Microbiol.* 1997 May;56(1-2):99-109.

Eckmann L, Kagnoff MF, Fierer J. Epithelial cells secrete the chemokine interleukin-8 in response to bacterial entry. *Infect Immun.* 1993 Nov;61(11):4569-74.

Edwards PR, Ewing WH. 1972. Identification of *Enterobacteriaceae*. Burgess Publishing Company, Minneapolis. MN, USA.

Epinfo, 2000, 2003, 2004, 2006.

EU Zoonózis Rendeletek 2003, 2006.

Farkas T, Kiss J, Olasz F. The construction and characterization of an effective transpositional system based on IS30. *FEBS Lett.* 1996 Jul 15;390(1):53-8.

Fu Y, Galan JE. A salmonella protein antagonizes Rac-1 and Cdc42 to mediate host-cell recovery after bacterial invasion. *Nature.* 1999 Sep 16;401(6750):293-7.

Fu Y, Galan JE. The *Salmonella* typhimurium tyrosine phosphatase SptP is translocated into host cells and disrupts the actin cytoskeleton. *Mol Microbiol.* 1998 Jan;27(2):359-68.

Gado I, Laszlo VG, Nagy B, Milch H, Drin I, Awad-Masalmeh M, Horvath J. Phage restriction and the presence of small plasmids in *Salmonella* enteritidis. *Zentralbl Bakteriol.* 1998 May;287(4):509-19.

Garcia-del Portillo F. *Salmonella* intracellular proliferation: where, when and how? *Microbes Infect.* 2001 Nov-Dec;3(14-15):1305-11.

Gast RK, Stone HD, Holt PS, Beard CW. Evaluation of the efficacy of an oil-emulsion bacterin for protecting chickens against *Salmonella* enteritidis. *Avian Dis.* 1992 Oct-Dec;36(4):992-9.

Gibson TJ. 1984. Studies on the Epstein-Barr virus genome. Ph.D. thesis, Cambridge University, England.

Glasgow AC, Hughes KT, Simon MI. 1989. Bacterial Inversion Systems. In: *Mobile DNA*. Eds.: Berg DE, Howe MM. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 637-660.

Gulig PA, Doyle TJ. The *Salmonella* typhimurium virulence plasmid increases the growth rate of salmonellae in mice. *Infect Immun*. 1993 Feb;61(2):504-11.

Hacker J, Blum-Oehler G, Muhldorfer I, Tschape H. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol Microbiol*. 1997 Mar;23(6):1089-97.

Halavatkar H, Barrow PA. The role of a 54-kb plasmid in the virulence of strains of *Salmonella* enteritidis of phage type 4 for chickens and mice. *J Med Microbiol*. 1993 Mar;38(3):171-6.

Hanafusa T, Saito K, Tominaga A, Enomoto M. Nucleotide sequence and regulated expression of the *Salmonella fljA* gene encoding a repressor of the phase 1 flagellin gene. *Mol Gen Genet*. 1993 Jan;236(2-3):260-6.

Haneda T, Okada N, Nakazawa N, Kawakami T, Danbara H. Complete DNA sequence and comparative analysis of the 50-kilobase virulence plasmid of *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis. *Infect Immun*. 2001 Apr;69(4):2612-20.

Haniford DB, 2002. Transposon Tn10. In: *Mobile DNA II*. Eds.: Craig NL, Craigie R, Gellert M, Lambowitz AM., ASM Press, Washington, p. 457-483.

Hansen-Wester I, Hensel M. *Salmonella* pathogenicity islands encoding type III secretion systems. *Microbes Infect*. 2001 Jun;3(7):549-59.

Hartung M, Slack M, Kemper B. Analyses of spontaneous mutations of cloned gene 49 of phage T4. *Mutat Res*. 2001 Feb 20;473(2):201-10.

Hassan JO, Curtiss R 3rd. Development and evaluation of an experimental vaccination program using a live avirulent *Salmonella* typhimurium strain to protect immunized chickens against challenge with homologous and heterologous *Salmonella* serotypes. Infect Immun. 1994 Dec;62(12):5519-27.

Hassan JO, Curtiss R 3rd. Effect of vaccination of hens with an avirulent strain of *Salmonella* typhimurium on immunity of progeny challenged with wild-Type *Salmonella* strains. Infect Immun. 1996 Mar;64(3):938-44.

Hassan JO, Curtiss R 3rd. Efficacy of a live avirulent *Salmonella* typhimurium vaccine in preventing colonization and invasion of laying hens by *Salmonella* typhimurium and *Salmonella* enteritidis. Avian Dis. 1997 Oct-Dec;41(4):783-91.

Hayward RD, Koronakis V. Direct nucleation and bundling of actin by the SipC protein of invasive *Salmonella*. EMBO J. 1999 Sep 15;18(18):4926-34.

Heffernan EJ, Harwood J, Fierer J, Guiney D. The *Salmonella* typhimurium virulence plasmid complement resistance gene *rck* is homologous to a family of virulence-related outer membrane protein genes, including *pagC* and *ail*. J Bacteriol. 1992 Jan;174(1):84-91.

Hensel M. *Salmonella* pathogenicity island 2. Mol Microbiol. 2000 Jun;36(5):1015-23.

Herrero M, de Lorenzo V, Timmis KN. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. J Bacteriol. 1990 Nov;172(11):6557-67.

Hinton M, Pearson GR, Threlfall EJ, Rowe B, Woodward M, Wray C. Experimental *Salmonella* enteritidis infection in chicks. Vet Rec. 1989 Mar;124(9):223.

Hobbie S, Chen LM, Davis RJ, Galan JE. Involvement of mitogen-activated protein kinase pathways in the nuclear responses and cytokine production induced by *Salmonella* typhimurium in cultured intestinal epithelial cells. J Immunol. 1997 Dec 1;159(11):5550-9.

Hopper SA, Mawer S. *Salmonella* enteritidis in a commercial layer flock. Vet Rec. 1988 Sep 24;123(13):351.

Hynes MF, Quandt J, O'Connell MP, Puhler A. Direct selection for curing and deletion of *Rhizobium* plasmids using transposons carrying the *Bacillus subtilis sacB* gene. *Gene*. 1989 May 15;78(1):111-20.

Imre A, Olasz F, Kiss J, Nagy B. A novel transposon-based method for elimination of large bacterial plasmids. *Plasmid*. 2006 May;55(3):235-41.

Imre A, Olasz F, Nagy B. Development of a PCR system for the characterisation of *Salmonella* flagellin genes. *Acta Vet Hung*. 2005;53(2):163-72.

Jepson MA, Clark MA. The role of M cells in *Salmonella* infection. *Microbes Infect*. 2001 Nov-Dec;3(14-15):1183-90.

Jesenberger V, Procyk KJ, Yuan J, Reipert S, Baccarini M. *Salmonella*-induced caspase-2 activation in macrophages: a novel mechanism in pathogen-mediated apoptosis. *J Exp Med*. 2000 Oct 2;192(7):1035-46.

Jones CJ, Aizawa S. The bacterial flagellum and flagellar motor: structure, assembly and function. *Adv Microb Physiol*. 1991;32:109-72.

Jones GW, Richardson LA, Uhlman D. The invasion of HeLa cells by *Salmonella typhimurium*: reversible and irreversible bacterial attachment and the role of bacterial motility. *J Gen Microbiol*. 1981 Dec;127(2):351-60.

Joys TM. The covalent structure of the phase-1 flagellar filament protein of *Salmonella typhimurium* and its comparison with other flagellins. *J Biol Chem*. 1985 Dec 15;260(29):15758-61.

Kado CI, Liu ST. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J Bacteriol*. 1981 Mar;145(3):1365-73.

Kilger G, Grimont PA. Differentiation of *Salmonella* phase 1 flagellar antigen types by restriction of the amplified *fliC* gene. *J Clin Microbiol*. 1993 May;31(5):1108-10.

Kingsley RA, Baumler AJ. Host adaptation and the emergence of infectious disease: the *Salmonella* paradigm. *Mol Microbiol*. 2000 Jun;36(5):1006-14.

Kiss J, Olasz F. Formation and transposition of the covalently closed IS30 circle: the relation between tandem dimers and monomeric circles. *Mol Microbiol*. 1999 Oct;34(1):37-52.

Knodler LA, Finlay BB. *Salmonella* and apoptosis: to live or let die? *Microbes Infect*. 2001 Nov-Dec;3(14-15):1321-6.

Laszlo VG, Csorian ES, Milch H. Comparison of two *Salmonella enteritidis* phage typing methods. *Acta Microbiol Hung*. 1993;40(3):255-63.

Le Minor L, Veron M, Popoff M. Taxonomie des *Salmonella*. *Ann Microbiol (Paris)*. 1982 Sep-Oct;133(2):223-43.

Li J, Smith NH, Nelson K, Crichton PB, Old DC, Whittam TS, Selander RK. Evolutionary origin and radiation of the avian-adapted non-motile salmonellae. *J Med Microbiol*. 1993 Feb;38(2):129-39.

Lin JS, Tsen HY. Development and use of polymerase chain reaction for the specific detection of *Salmonella* Typhimurium in stool and food samples. *J Food Prot*. 1999 Oct;62(10):1103-10.

Lister SA. *Salmonella enteritidis* infection in broilers and broiler breeders. *Vet Rec*. 1988 Sep 24;123(13):350.

Loströh CP, Lee CA. The *Salmonella* pathogenicity island-1 type III secretion system. *Microbes Infect*. 2001 Nov-Dec;3(14-15):1281-91.

Macnab RM. 1996. Flagella and Motility In: *Escherichia coli and Salmonella Cellular and Molecular Biology*. Ed.: Neidhardt FC. ASM Press, Washington, D.C., 123-145.

Matsui H, Bacot CM, Garlington WA, Doyle TJ, Roberts S, Gulig PA. Virulence plasmid-borne *spvB* and *spvC* genes can replace the 90-kilobase plasmid in conferring virulence to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in subcutaneously inoculated mice. J Bacteriol. 2001 Aug;183(15):4652-8.

Mesas JM, Rodriguez MC, Alegre MT. Plasmid curing of *Oenococcus oeni*. Plasmid. 2004 Jan;51(1):37-40.

Methner U, al-Shabibi S, Meyer H. Experimental oral infection of specific pathogen-free laying hens and cocks with *Salmonella enteritidis* strains. Zentralbl Veterinarmed B. 1995 Oct;42(8):459-69.

Methner U, Barrow PA. Significance of motility of *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* as a virulence factor and on the expression of the inhibition phenomenon in vitro and in vivo in SPF chickens Berl Munch Tierarztl Wochenschr. 1997 Oct;110(10):391-6.

Meyer H, Koch H, Methner U, Steinbach G. Vaccines in salmonellosis control in animals. Zentralbl Bakteriologie. 1993 Apr;278(2-3):407-15.

Monack DM, Hersh D, Ghori N, Bouley D, Zychlinsky A, Falkow S. *Salmonella* exploits caspase-1 to colonize Peyer's patches in a murine typhoid model. J Exp Med. 2000 Jul 17;192(2):249-58.

Nagaraja KV, Rajashekara G. 1999. Vaccination against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis infection: dilemma and realities. In: *Salmonella enterica serovar Enteritidis in humans and animals* Ed.: Saeed, A.M. Iowa State University Press, Ames, USA, 95, 14054-14059.

Nagy B, Bitay Z, Kovács S, Nógrády N. A salmonellosisok elleni védekezés újabb lehetőségei az állategészségügyben. Magy. Áo. Lapja 2001 123:670-8.

Nagy B, Kovács S, Kostyák A, Bitay Z. A salmonellosis élelmiszer-biztonsági jelentősége és a károk csökkentésének hazai lehetőségei. Magy. Ao. Lapja 1997 119:627-85.

Nagy B, Kovács S, Milch H, Bitay Z, Lantos Cs, Szentgáliné E, Gadóné LV, Kostyák Á. A baromfi-salmonellosis: közegészségügyi és állat-egészségügyi vonatkozások, védekezési alapelvek. Magy. Áo. Lapja 1993 48:397-406.

Nagy B. A keresztvédelem jelentősége a baromfi salmonellosis elleni immunizálásban. Magy. Áo. Lapja 1999 121:179-180.

Nagy Z, Szabo M, Chandler M, Olasz F. Analysis of the N-terminal DNA binding domain of the IS30 transposase. Mol Microbiol. 2004 Oct;54(2):478-88.

Nogrady N, Imre A, Rychlik I, Barrow PA, Nagy B. Genes responsible for anaerobic fumarate and arginine metabolism are involved in growth suppression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium *in vitro*, without influencing colonisation inhibition in the chicken *in vivo*. Vet Microbiol. 2003 Dec 30;97(3-4):191-9.

Nogrady N, Imre A, Rychlik I, Barrow PA, Nagy B. Growth and colonization suppression of *Salmonella enterica* serovar Hadar *in vitro* and *in vivo*. FEMS Microbiol Lett. 2003 Jan 21;218(1):127-33.

Novick RP. Plasmid incompatibility. Microbiol Rev. 1987 Dec;51(4):381-95.

Okazaki N, Matsuo S, Saito K, Tominaga A, Enomoto M. Conversion of the *Salmonella* phase 1 flagellin gene *fliC* to the phase 2 gene *fljB* on the *Escherichia coli* K-12 chromosome. J Bacteriol. 1993 Feb;175(3):758-66.

Olasz F, Kiss J, Konig P, Buzas Z, Stalder R, Arber W. Target specificity of insertion element IS30. Mol Microbiol. 1998 May;28(4):691-704.

Olasz F, Stalder R, Arber W. Formation of the tandem repeat (IS30)₂ and its role in IS30-mediated transpositional DNA rearrangements. Mol Gen Genet. 1993 May;239(1-2):177-87.

Pickett MA, Everson JS, Peard PJ, Clarke IN. The plasmids of *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydomphila pneumoniae* (N16): accurate determination of copy number and the paradoxical effect of plasmid-curing agents. Microbiology. 2005 Mar;151(Pt 3):893-903.

Poppe C, Gyles CL. Tagging and elimination of plasmids in *Salmonella* of avian origin. *Vet Microbiol.* 1988 Sep;18(1):73-87.

Revell PA, Miller VL. *Yersinia* virulence: more than a plasmid. *FEMS Microbiol Lett.* 2001 Dec 18;205(2):159-64.

Rotger R, Casadesus J. The virulence plasmids of *Salmonella*. *Int Microbiol.* 1999 Sep;2(3):177-84.

Sadeyen JR, Trotereau J, Velge P, Marly J, Beaumont C, Barrow PA, Bumstead N, Lalmanach AC. *Salmonella* carrier state in chicken: comparison of expression of immune response genes between susceptible and resistant animals. *Microbes Infect.* 2004 Nov;6(14):1278-86.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: A laboratory manual.* CSH Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA

Simon R, Prierer U, Pühler A. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in bacteria. *Biotechnology* 1983 1:784-791.

Stalder R, Caspers P, Olasz F, Arber W. The N-terminal domain of the insertion sequence 30 transposase interacts specifically with the terminal inverted repeats of the element. *J Biol Chem.* 1990 Mar 5;265(7):3757-62.

Stojiljkovic I, Trgovcevic Z, Salaj-Smic E. Tn5-*rpsL*: a new derivative of transposon Tn5 useful in plasmid curing. *Gene.* 1991 Mar 1;99(1):101-4.

Szabo M, Kiss J, Kotany G, Olasz F. Importance of illegitimate recombination and transposition in IS30-associated excision events. *Plasmid.* 1999 Nov;42(3):192-209.

Szabo M, Muller F, Kiss J, Balduf C, Strahle U, Olasz F. Transposition and targeting of the prokaryotic mobile element IS30 in zebrafish. *FEBS Lett.* 2003 Aug 28;550(1-3):46-50.

Szmollény G, Tóth I, Rásky K, Péterfy F, Dinjus U, van Zijderveld FV, Nagy B. Modified monoclonal antibody enzyme-linked immunosorbent assays for detection of specific antibodies to *Salmonella* enteritidis in poultry. Book of Abstracts, 13 th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, 1999 p100.

Takeuchi A. Electron microscope studies of experimental *Salmonella* infection. I. Penetration into the intestinal epithelium by *Salmonella* typhimurium. Am J Pathol. 1967 Jan;50(1):109-36.

Threlfall EJ, Hall ML, Rowe B. *Salmonella* bacteraemia in England and Wales, 1981-1990. J Clin Pathol. 1992 Jan;45(1):34-6.

Timms LM, Marshall RN, Breslin MF. Laboratory assessment of protection given by an experimental *Salmonella* enteritidis PT4 inactivated, adjuvant vaccine. Vet Rec. 1990 Dec 22-29;127(25-26):611-4.

Tinge SA, Curtiss R 3rd. Conservation of *Salmonella* typhimurium virulence plasmid maintenance regions among *Salmonella* serovars as a basis for plasmid curing. Infect Immun. 1990 Sep;58(9):3084-92.

Uzzau S, Brown DJ, Wallis T, Rubino S, Leori G, Bernard S, Casadesus J, Platt DJ, Olsen JE. Host adapted serotypes of *Salmonella* enterica. Epidemiol Infect. 2000 Oct;125(2):229-55.
van Asten AJ, Zwaagstra KA, Baay MF, Kusters JG, Huis in't Veld JH, van der Zeijst BA. Identification of the domain which determines the g,m serotype of the flagellin of *Salmonella* enteritidis. J Bacteriol. 1995 Mar;177(6):1610-3.

Van Asten FJ, Hendriks HG, Koninkx JF, Van der Zeijst BA, Gaastra W. Inactivation of the flagellin gene of *Salmonella enterica* serotype enteritidis strongly reduces invasion into differentiated Caco-2 cells. FEMS Microbiol Lett. 2000 Apr 15;185(2):175-9.

van der Velden AW, Lindgren SW, Worley MJ, Heffron F. *Salmonella* pathogenicity island 1-independent induction of apoptosis in infected macrophages by *Salmonella enterica* serotype typhimurium. Infect Immun. 2000 Oct;68(10):5702-9.

Van Immerseel F, Methner U, Rychlik I, Nagy B, Velge P, Martin G, Foster N, Ducatelle R, Barrow PA. Vaccination and early protection against non-host-specific *Salmonella* serotypes in poultry: exploitation of innate immunity and microbial activity. *Epidemiol Infect.* 2005 Dec;133(6):959-78.

van Zijderveld FG, van Zijderveld-van Bommel AM, Brouwers RA, de Vries TS, Landman WJ, de Jong WA. Serological detection of chicken flocks naturally infected with *Salmonella* enteritidis, using an enzyme-linked immunosorbent assay based on monoclonal antibodies against the flagellar antigen.

Varga J, Tuboly S, Mészáros J. 1999. A háziállatok fertőző betegségei, Állatorvosi járványtan II. Budapest, Mezőgazda kiadó

Vazquez-Torres A, Fang FC. *Salmonella* evasion of the NADPH phagocyte oxidase. *Microbes Infect.* 2001 Nov-Dec;3(14-15):1313-20.

Wallis TS, Galyov EE. Molecular basis of *Salmonella*-induced enteritis. *Mol Microbiol.* 2000 Jun;36(5):997-1005.

Wallis TS. 2006. Host specificity of *Salmonella* infections in animal species. In: *Salmonella infections Clinical, Immunological and molecular aspects*. Ed.: Mastroeni, P. and Maskell, D. Cambridge University Press, Cambridge, UK

Wood MW, Mahon J, Lax AJ. Development of a probe and PCR primers specific to the virulence plasmid of *Salmonella* enteritidis. *Mol Cell Probes.* 1994 Dec;8(6):473-9.

Woodward MJ, Gettinby G, Breslin MF, Corkish JD, Houghton S. The efficacy of Salenvac, a *Salmonella* enterica subsp. Enterica serotype Enteritidis iron-restricted bacterin vaccine, in laying chickens. *Avian Pathol.* 2002 Aug;31(4):383-92.

Zhou D, Galan J. *Salmonella* entry into host cells: the work in concert of type III secreted effector proteins. *Microbes Infect.* 2001 Nov-Dec;3(14-15):1293-8.

Zhou D, Mooseker MS, Galan JE. Role of the *S. typhimurium* actin-binding protein SipA in bacterial internalization. *Science*. 1999 Mar 26;283(5410):2092-5.

Zinder ND, Lederberg J. Genetic exchange in *Salmonella*. *J Bacteriol*. 1952 Nov;64(5):679-99.

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.

Proceeding:

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.

Abstractok:

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 14th Intern.Congr., Hung. Soc. Microbiol., Balatonfüred, B37., Előadás
8. **Imre A.**, Olasz F., Nagy B. (2004): *Salmonella* Enteritidis törzsek célzott transzpozon –mutagenezise 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 előállítása irányított mutagenezissel. 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

11. **Nagy B.**, Szigeti G., Kostyák Á., Imre A., Szmolka A. (2006): About pathogenic significance of *Salmonella* Infantis in broilers. Annual Meeting of the Hungarian Society for Microbiology, October 18-20, 2006 Keszthely, Hungary, Acta Microbiologica and Immunologica Hungarica 53 (3) p320
12. **Nógrády N.**, Imre A., Kostyák Á., Pászti J., Nagy B. (2006): Pheno- and genotypic characterisation of recent *Salmonella* Infantis isolates from human and animal sources. Annual Meeting of the Hungarian Society for Microbiology, October 18-20, 2006 Keszthely, Hungary, Acta Microbiologica and Immunologica Hungarica 53 (3) p323
13. **Szmolka A.**, Imre A., Nagy B. (2006): Real-time PCR assays on cytokine response to *Salmonella* and its relation to invasiveness. Annual Meeting of the Hungarian Society for Microbiology, October 18-20, 2006 Keszthely, Hungary, Acta Microbiologica and Immunologica Hungarica 53 (3) p349

Egyéb előadások

1. **Imre A.**, Olasz F., Nagy B. (2003): A flagellin termelésben szerepet játszó gének jelenlétének vizsgálata különböző *Salmonella* szerovariánsokban
Akadémiai Beszámolók, Virologia, Immunológia, Bakteriológia p27. Előadás
2. **Imre A.**, Olasz F. Nagy B. (2004): *Salmonella* Enteritidis flagellin-szintézisének gátlása irányított mutagenezissel
Akadémiai Beszámolók, Virologia, Immunológia, Bakteriológia p8. Előadás
3. **Imre, A.**, Szmolka A., Nagy B. (2004): Further colonization and cross inhibition studies on *Salmonella* Hadar-18
EU Supasalvac értekezlet, Budapest, 2004. Juli 8-9.
4. **Imre A.**, Olasz F., Nagy B. (2005): *Salmonella* Enteritidis virulenciájának csökkentése a virulencia plazmidra irányuló delécióval
Akadémiai Beszámolók, Virologia, Immunológia, Bakteriológia p34. Előadás

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.