

**OTKA nyilvántartási szám: T 037890**

## **SZAKMAI ZÁRÓJELENTÉS**

**A téma címe: Egy új citotoxinak, a cythoethalis distending toxinnak (CDT) magyarországi előfordulása és molekuláris biológia jellemzése**

**A kutatás időtartama: 2002-2005**

### **Bevezetés és célkitűzések**

A cytolethalis duzzasztó (distending) toxin (CDT) egy új és nagy jelentőséggel rendelkező bakteriális citotoxin család. A CDT-t első sorban *Escherichia coli* termeli, de egyéb humán és állatorvosi jelentőséggel rendelkező baktérium fajokban is kimutatták. A CDT az első olyan bakteriális toxin, amely az arra érzékeny eukarióta sejtek mitózist megakadályozza azáltal, hogy a sejtciklust a G2/M fázis határán specifikusan leállítja. Az elsőként humán enteropathogén *E. coli*-ban (EPEC) kimutatott toxin mások és saját vizsgálataink szerint is egyéb pathogenetikai csoportokban is előfordul: így pl. kimutattuk a CDT-t a malacok választási hasmenésében és humán uropathogén törzsekben is.

Jelen pályázati munka célja volt

- A CDT-nek különböző haszonállatokból, emberből és élelmiszerből izolált *E. coli* és egyéb baktérium (*Salmonella*, *Enterobacter*, *Shigella*) törzsekben való elterjedtségének vizsgálata
- A CDT-termelő *E. coli* törzsek egyéb virulencia faktorainak és fenotípusos tulajdonságainak meghatározásával a jellegzetes Magyarországon elterjedt klónok molekulárbiológiai jellemzését kívántuk adni
- A diagnosztikai munka fejlesztésére a *cdt* kimutatására és tipizálására alkalmas különböző PCR módszereket kívántunk kialakítani. Ezen túl nemzetközi együttműködés keretében CDT specifikus monoklonális ellenanyagokat kívántunk előállítani
- Feltételezve egy új *cdt* variáns létezését, terveztük annak a genetikai jellemzését, a *cdt* operonnak a klónozását és nukleotid sorrendjének a meghatározását,
- Valamint az új toxint hordozó reprezentatív törzssel állatkísérlet végzését.

### **Az elvégzett munka és eredmények**

#### **A CDT monitorozása és a CDT-termelő *E. coli* törzsek fenotípusos jellemzése**

Az eredeti célkitűzéseinknek megfelelően hazai haszonállatokból, emberből és élelmiszerekből izolált *E. coli* törzsekben monitoroztuk a CDT elterjedését. A vizsgálataink kiterjedtek sertésből, nyúlból, baromfiból, és főként húgyúti infekciók során emberből izolált *E. coli* törzsekre, de vizsgáltunk vérhast okozó enteroinvazív *E. coli* (EIEC) és *Shigella*

törzseket valamint a Nemzeti Orvosi Törzsgyűjtemény referencia törzsei közül *S. sonnei* (n=3), *S. flexneri* (n=2), *S. boydii* (n=3), *S. dysenteriae* (n=3) referencia törzseket, 1-1 *Enterobacter cloacae*, ill. *Enterobacter agglomerans* és két *Citrobacter freundii* referencia törzset, ill. 1-1 *Salmonella enteritidis*, *S. hadar* és *S. infantis* törzset. Nyolcvan vérhas-eredetű *E. coli* törzset, melyek 12 különböző szerocsoportba tartoztak és 43 *Shigella* – 23 *S. flexneri*, 13 *S. sonnei*, 2 *S. boydii* és 1 *S. dysenteriae*– törzset Pál Tibor (PTE, ÁOK) bocsátotta rendelkezésünkre.

Mivel a *cdtABC* operon génjei közül a *cdtB* gén a legkonzerváltabb, ezért egy olyan multiplex PCR rendszert terveztünk és alkalmaztunk, mely a *cdtB* génre 2-2 primert tartalmazott. Ezen rendszer alkalmasnak bizonyult minden eddig szekvenált *cdt* gén (*cdtI*, *cdtII* és *cdtIII*) kimutatására (Tóth I. és mtsai, 2003 a).

A korábbi ilyen irányú enterotoxikus *E. coli* (ETEC) vizsgálatokkal ellentétben sertések választási hasmenéséből izolált 82 enteropathogén *E. coli* (EPEC) egyike sem hordozta a *cdt* gént. Szintén nem fordult elő a *cdt* gén a nyulak hasmenéses megbetegedéseiből izolált 70 *E. coli* törzsben. Az extraintesztinális kórképekből származó baromfi eredetű *E. coli* (APEC) törzsek 10,1 %-ban (7/69) mutattuk ki a *cdt* gént, viszont nem jellemezte az intesztinális törzseket. Hús élelmiszer eredetű mintát vizsgálva egy baromfi eredetű törzsben mutattuk ki a *cdtB* gént. A vérhas eredetű törzsek közül egy O112 szerocsoportú EIEC és egy *S. sonnei* törzs hordozta a *cdt* gént. Sem a referencia törzsekben, sem a vizsgált *Salmonella* törzsekben nem fordult elő a *cdt* gén.

Líbiában gyermekekből izolált 50 *E. coli* törzset jellemeztünk, melyből 20 törzs származott hasmenéses gyermekek székletéből és 30 törzs származott egészséges gyermekek székletéből. A hasmenéses izolátumok között gyakran fordult elő EPEC és enteroaggregatív (EAEC) törzs. Egy O22 szerocsoportú nem-EPEC/nem-EAEC hasmenéses eredetű törzsben mutattuk ki a *cdtB* gént. A törzsben további virulencia faktor gént nem tudtunk azonosítani (Dow és mtsai, 2006, in press). Az egészségesekből származó törzsekben nem fordult elő a *cdt* gén, amely egy esetleges új pathotípust jelezhet. Közleményünkben a törzsek részletes geno- (virulencia gén, integron meghatározás és tipizálás) és fenotípusos jellemzését (szerotipizálás, *in vitro* adhéziós vizsgálatok és antibiotikum rezisztencia meghatározása) adtuk. Ezen munka részét képezi egy külföldi PhD ösztöndíjas (M. Dow) "Comparative analysis of enteric pathogenic *Escherichia coli* strains from young children and rabbits" c. PhD dolgozatának. A dolgozat beadásának várható időpontja 2006.

A *cdt*-pozitív *E. coli* törzsekben a *cdt* gén jelenlétét kolónia hibridizációs vizsgálatokkal megerősítettük és reprezentatív törzsek CDT termelését Hela szövettenyészetet alkalmazva bizonyítottuk. Southern hibridizációs vizsgálataink szerint a sertés, a baromfi és a humán eredetű törzsek teljes genomialis DNS mintáit vizsgálva megállapítottuk, hogy a *cdt* gének a különböző fajok esetén eltérő méretű fragmenteken lokalizálódnak. Csupán a baromfi eredetű törzsekben kaptunk azonos hibridizációs mintázatot, több enzimmel (*HincII*, *BglI*) való hasítást követően is egyezést tapasztalva.

## **Egy új CDT típus (CDT-IV) első leírása**

Nemzetközi együttműködésben részletesen jellemeztünk egy humán és állati eredetű *E. coli* törzsből álló reprezentatív CDT-termelő gyűjteményt. A kollekció humán,

szarvasmarha, sertés, bárány, baromfi, pinty és élelmiszer eredetű törzseket tartalmazott, összesen 9 különböző országból (8 európai ország és USA) származtak, s a törzsek igen változatos szerocsoportokba tartoztak. A *cdtB* univerzális primerek megerősítették a fenotípusos vizsgálatok eredményeit és az addig ismert *cdt* gén típusokra *cdtB* génekben lévő szekvencia különbségek alapján *cdt-I*, *cdt-II* és *cdt-III* típus specifikus primereket terveztünk és tipizáltuk a CDT-termelő törzsek *cdt* génjeit. Ezen PCR primerekkel a gének többségét eredménnyel tipizáltuk. Az ú.n. „nem-tipizálható” törzsekben viszont új *cdt* variánst, a CDT-IV toxint írtuk le: *cdtB-IV* szekvencia (GénBanki száma: AY162217). Az új toxinra tervezett specifikus primerekkel a *cdt-IV* gént kimutattuk intesztinális és extraintesztinális kórképekből származó humán, sertés és baromfi eredetű törzsekben. *In vitro* vizsgálataink szerint a CDT-IV toxin a megvizsgált törzs mindegyikében sejt-asszociált volt. A toxicitás mértéke megegyezett a CDT-III hatásával, ill. kevésbé toxikus, mint a szekretálódott CDT-I toxin (Tóth I. és mtsai, 2003 a.).

Az extraintesztinális kórképekből izolált baromfi eredetű *E. coli* izolátumokban kimutatott *cdtB* egységesen *cdt-IV* -nek bizonyult. A vizsgált 46 intesztinális eredetű baromfi törzsben a *cdt* nem fordult elő (Tóth I. és mtsai, 2003, MMT). A baromfi eredetű törzseket számos virulencia gén jellemezte, gyakran hordozták a „high pathogenicity island” (HPI) patogenitási szigetet (*fyuA*), *traT* (szérum rezisztenciát kódoló) gént, az *aerJ* aerobactin receptor gént, a hőérzékeny haemagglutinint kódoló *tsh* gént, ill. kivétel nélkül rendelkeztek az I típusú fimbria *fimH* marker génjével, viszont P fimbriát kódoló gén szintén csak az extraintesztinális eredetű törzsekben fordult elő. A CDT-termelő baromfi eredetű törzsek eddig nem ismert (új) szerocsoportokba tartoztak (O115, O53) és a vizsgált tulajdonságok alapján két új klónt alkotnak. Egységesen (7/7) rendelkeztek a *fyuA*, *traT*, *aerJ*, *fimH* génekkel, viszont csak az O115 törzsek termeltek colicint (5/5) és csak az O53 (2/2) törzsek hordozták a *tsh* gént.

## A molekuláris diagnosztikai fejlesztések

A *cdt*- diagnosztikus és tipizáló primerekkel vizsgáltunk további 353 Magyarországon izolált humán eredetű *E. coli* törzset, melyek közül 190 *E. coli* törzs húgyúti infekcióból (UPEC), 51 egyéb extraintesztinális fertőzésből, 112 törzs pedig egészséges egyedek székletéből származott. Az UPEC törzsek 7,9 % -a (15/190), az extraintesztinális nem-UPEC törzsek 5,9 % -a (3/51) tartalmazott *cdt* gént. A széklet eredetű törzsek közül csupán egy páciensből mutattuk a *cdtB* gént (0,9%). Ezen *cdt*<sup>+</sup> törzsek közül 14 bizonyult *cdt-IV*-nek, és 5 törzsből a *cdt-I* volt kimutatható. A CDT-IV- termelő humán extraintesztinális törzsek az O2, O6, O75 és O170 szerocsoportúaknak bizonyultak (Tóth I. és mtsai, 2003 J Clin Microbiol).

A diagnosztikai munkákban együttműködő partnerünk (H. Ball, Belfast) az általunk azonosított (Tóth I. és mtsai., 2003a) *cdtB-IV* szekvencia ismeretében szintetizált rekombináns antigénnel BALB/c egeret immunizálva standard fúziós eljárással nagy számú CDT-specifikus monoklonális ellenanyagot állított elő. Az ELISA rendszerben pozitívnak bizonyult ellenanyag-termelő klónok (n=30) tisztítását elvégezve rendelkezünk három olyan klónnal, amely immuno blot analízisben is specifikusan kötődött a CDT-IV specifikus szintetikus antigénhez. A záró évben végzett kiterjedt ELISA vizsgálatok eredményei szerint azonban jelenleg nem tekinthetők ezen savók megfelelő diagnosztikus savóknak, mivel a tesztelt ellenanyagok egyelőre *cdt*-negatív törzsszel is reagáltak.

## A *cdt-IV* genetikai jellemzői

A szekvencia analízis eredményei szerint a *cdtB-IV* 84%-ban megegyezik a *cdtB-I* génnel. A *cdtB-IV* jelentősebben eltér mind a *cdtB-II*, mind a *cdtB-III* géntől, a homológia mértéke 55% ill. 54%.

Ez idáig egyetlen, sertés eredetű O75 törzsből (28c) szekvenáltak a teljes *cdtABC-IV* operont és annak környezetét (Oswald és mtsai, Gén banki szám: gi:50983070). A 28c prototípus törzsből a *cdt* operont fág eredetű gének veszik közre. Ezen génbanki adatok alapján tervezett PCR primerekkel E. Oswalddal (ENVT, Toulouse) együttműködve reprezentatív törzseket vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a *cdt-IV* operont gyakran határolják ugyanezek a fág eredetű gének, függetlenül a törzsek eredetétől. Azonban evolúciogenetikai szempontból fontosnak tartjuk megemlíteni, hogy a vizsgált két O115 baromfi törzs esetében a *cdtC* gént a fág eredetű proteáz gén határolja, viszont a *cdtA* környezete eltér a sertés eredetű O75 prototípus törzs környezetétől (*Oswald és Tóth nem publikált eredményei, kézirat közlésre előkészítve*). Az egyik saját O115 baromfi (E250) törzs - és a 28c jelzésű sertés törzs teljes genomjával végzett Southern hibridizációs vizsgálatok szerint, (négy enzimet is használva) megállapítottuk, hogy ezen törzsekben a *cdt* gének eltérő méretű fragmenteken foglalnak helyet, jelezvén, hogy a törzsek genomjai eltérő felépítésűek. Ezen hibridizációs eredmények alapján nem állapítható meg a *cdt-IV* operon integrációs helye sem.

Továbbá a munka folytatását illetően az is fontos lehet, hogy az összes baromfi eredetű CDT-IV termelő törzs lizogén. Spontán körülmények között és Mitomycin C indukciót követően is tudunk a törzsekből fágot kimutatni.

Hasonlóan fág eredetű gének határolják az időközben felfedezett EHEC O157 ill. egyéb szerocsoportú STEC törzseket alkalmanként jellemző *cdtV* operont is. Szintén jelen pályázat keretében a saját izolálású szarvasmarha eredetű *E. coli* O157:H7 és egyéb STEC törzsekben is kimutattuk a *cdtV* gén jelenlétét (*Tóth I, Lancz Zs, Nagy B., 2004*). Az általunk izolált *cdt*- pozitív szarvasmarha eredetű törzsekben a határoló régiót jelen pályázatban nem vizsgáltuk, viszont több ilyen törzsből szintén sikerült litikus fágot izolálni.

## Baromfi eredetű *cdtIV* operon klónozása és inaktiválása

Az O115 szerocsoportú CDT-IV termelő E250 törzsből Nagy Gáborral (PTE, ÁOK) együttműködésben SuprCos klón- könyvtárát alakítottunk ki, azzal a céllal, hogy a *cdtABC-IV* operont azonosítsuk. A reprezentatív cosmid könyvtárból nagy számú (n=1920) klónt vizsgáltunk PCR-rel, és két *cdtB-IV* specifikus klónt azonosítottunk. Az *cdt* operonnak a szekvenálását nehezítette az a tény, hogy a rekombináns cosmidból nagy gyakorisággal integrálódott a *cdt* operon a gazdatörzs kromoszómájába. A pozitív klónok további tisztítását követően rendelkezünk egy olyan stabil klónnal, melyben a *cdtIV* operon szekvenálását megkezdtük.

További célunk annak tisztázása, hogy a CDT-IV - mint virulencia faktor szerepet játszik-e a patogenitásban. Ennek kiderítésére a *cdtB-IV* gén (génbanki szám: AY162217) inaktiválásával kívántunk választ kapni. A fentebb említett együttműködés keretében (Schneider György PTE, ÁOK és Nagy Gábor) több stratégiát is kipróbálva, suicide vektoros homológ rekombinációs eljárással deletálta a *cdtB* gént az E250 jelzésű O115 baromfi törzsből. Az általunk használt suicide plazmid a pSG704 (*oriR6K*, *mobRP4*, M13 tg131,

Cm<sup>R</sup>, Schneider Gy., PhD tézis, 2005), amely Miller és Mekalanos által használt pGP704 (*oriR6K*, *mobRP4*, M13 *tg131*, Ap<sup>R</sup>) származéka. A klóramfenikol rezisztenciát (Cm<sup>R</sup>) hordozó pSG704 használatára az E250 ampicillin rezisztenciája miatt volt szükség. A *cdtB* gén delécióját PCR-rel igazoltuk. A CDT mutáció fenotípusos megnyilvánulását HeLa sejttenyészetben is ellenőriztük.

## Állatkísérletek

A korábbi OTKA pályázatunk során részletesen jellemzett *E. coli* O157H7 és antibiotikum-rezisztens O157:NM ill. hipermotilis törzsek *in vivo* összehasonlító virulencia vizsgálataiban sikerrel alkalmaztunk egy iv. egér modellt (Tóth I, Csík M. Emődy L., 2003, *Acta Vet*). Ezen eredményeink alapján logikusnak éreztük, hogy jelen pályázatunkban a tervezett költséges sertés fertőzési kísérletek helyett szintén a jóval kisebb anyagi ráfordítást jelentő egér modellt alkalmazzuk a virulencia vizsgálatokban. Választásunk helyesnek bizonyult, hiszen a CDT-IV termelő E250 jelzésű O115 szerocsoportú baromfi eredetű törzs hatására az egerek dózis-függő elhullását tapasztaltuk, míg a kontrollként használt *E. coli* K-12 (C600) törzs esetében egyetlen állat sem pusztult el.

Az E250 szülői és E250( $\Delta$ *cdtB*) izogén mutáns törzssel végzett egér fertőzési kísérletekben szignifikáns eltérést nem tapasztaltunk az E250 szülői ill. *cdt*-mutáns törzs okozta elhullások között. A mutáns ill. a szülői törzs közel azonos elhullási kinetika szerint és azonos hatékonysággal pusztították az egereket.

Ezen eredményeink alapján úgy tűnhet, hogy a CDT-IV nem feltétlenül tekinthető olyan elsődleges virulencia faktornak, amelynek hiányában elmaradna a megbetegedés, azonban ezen kérdésnek a megnyugtató megválaszolása további vizsgálatokat igényel. Hiszen, az E250 további virulencia faktorokkal rendelkezik, így hordozza a teljes HPI patogenitási szigetet, ami vasértékesítést határozza meg, az aerobactin receptor gént, a colicintermelést kódoló virulencia plazmidot és szérum rezisztenciát kódoló *traT* gént is. Továbbá, az egérmodell mellett fontosnak tartjuk izogén törzspárral végzett virulencia vizsgálatokat napos csibében is elvégezni, amely rendszer talán még érzékenyebb detektálást tesz lehetővé.

## Megbeszélés

Célkitűzéseinknek megfelelően Magyarországon még szisztematikusan nem vizsgált citotoxinnak (CDT) az elterjedését vizsgáltuk és jellemeztük a citotoxikus törzseket azzal a céllal, hogy a jellemző virulens klónokat azonosítsunk. A CDT kimutatására és tipizálására alkalmas diagnosztikai PCR eljárást dolgoztunk ki, s a pályázat keretében a CDT-nek egy új típusát, a CDT-IV toxint fedeztük fel. A CDT-IV igen elterjedt, hiszen jellemezte a humán húgyúti fertőzéseket okozó (UPEC) törzseket, egyéb extraintesztinális infekciókból származó törzseket, ill. a sertések választási hasmenésének és baromfi szepszisének eseteiből izolált *E. coli* törzsek esetében csak a CDT-IV volt kimutatható.

Összefoglalva, CDT kimutatására és tipizálására alkalmas új PCR rendszert fejlesztettünk ki, melynek segítségével egy a humán és állati eredetű izolátumok széles körben elterjedt új toxint (CDT-IV) fedeztünk fel, ami valószínűleg új extraintesztinális virulencia faktor.

A virulencia faktorokat kódoló gének az esetek zömében mobilis genetikai elemeken (fágon, plazmidon, patogénitási szigeten vagy transzpozonon) lokalizálódnak és ennek következtében a virulencia gének horizontális terjedésében játszanak szerepet. Jelen pályázat eredményei szerint a *cdt-IV* operon is fágeredetű génekkel határos. Mindezek alapján fontosnak tartjuk a *cdtIV* pontos lokalizációjának a meghatározást, tisztázni, hogy az új toxint kódoló gének részét képezik-e egy profágnak, esetleg konvertáló fág genomjában foglalnak helyet, s így a fág további törzseket is képes lizogenizálni és toxikussá alakítani. A kérdés tanulmányozásának a feltételei adottak, hiszen rendelkezünk a pályázat keretében előállított antibiotikum rezisztencia kazettával hatástalanított CDT-IV toxint hordozó törzssel és egy alkalmas transzdukciós modellel is, melyet alkalmazva *in vivo* körülmények között, lekötött sertés bélkacsban, egy sertés eredetű O45 EPEC törzset sikerrel lizogenizáltunk *stx2* fággal (Tóth I. és mtsai, 2003, *Appl. Environ. Microbiol.*), jelezvén, hogy *in vivo* körülmények között is kialakulhat EPEC törzsből EHEC. Tudomásunk szerint ilyen transzdukciós eredményekről még nem számoltak be sem *cdt-IV*, sem a legújabban felfedezett *cdt-V* vonatkozásában.

