

Keresztvédelmet biztosító *Shigella* vakcina jelöltek karakterizálása

Egyetemi doktori (Ph.D.) tézisei

Dr Szijártó Valéria

Doktori iskola vezetője: Prof. Dr. Emőd Levente

Témavezető: Dr. Nagy Gábor



Pécsi Tudományegyetem

Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézet

Pécs

2013

1. Bevezetés

A *Shigella* a gammaproteobaktériumok osztályába, azon belül is az Enterobacteriaceae családba tartozó nemzetség (genus), mely hagyományosan négy fajra osztható; *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* és *S. sonnei*. A *Shigella* baktériumok human patogének, melyek a vastagbél invazív fertőzését, az úgynevezett shigellózist, vagy bakteriális dizentériát okozzák. Mindössze 10-100 baktérium elegendő a tünetek kialakulásához, melyek az enyhe, vizes hasmenéstől egészen a tényleges dizentériás megbetegedésig terjednek lázzal, tenezmussal és véres-nyákos hasmenéssel. Az akut, életet veszélyeztető szövődmények (úgy mint kiszáradás, hipoglikémia, vastagbél-perforáció, toxikus megacolon, peritonitis és Gram-negatív szepszis) gyermekekben gyakran vezetnek halálhoz, elsősorban a fejlődő országokban. A dizentériától különálló tünetegyüttes az úgynevezett hemolítikus urémiás szindróma (HUS), melyet (nem számítva az enterohemoragiás *E. coli* okozta megbetegedéseket) szinte kizárólag a Shiga-toxin termelő *S. dysenteriae* 1 törzsek okoznak.

1999-ben a WHO becslése szerint ~113 millió *Shigella* fertőzést detektáltak világszerte, közülük nagyjából 1 millió vezetett halálhoz, főként az öt év alatti gyermekek körében. Ugyan a *Shigella* fertőzések 90% fejlődő országokban fordul elő, a bakteriális dizentéria gyakori az endémiás területre utazók és az oda érkező katonai személyzet körében is, valamint iparosodott országokban rossz higiéniai körülmények közötti élő zárt közösségekben. Ez a nagyszámú eset, az antibiotikum rezisztens, azon belül is a multi drog rezisztens *Shigella* törzsek terjedése és a baktérium esetleges biológiai fegyverként való alkalmazása, mind alátámasztja egy *Shigella* elleni védőoltás szükségességét. Azonban az évtizedek óta tartó kiterjedt kutatások ellenére sincs törzskönyvezett *Shigella* vakcina, melynek egyik oka a nagyszámú különböző *Shigella* szerotípus és az ezen szerotípusok közti keresztvédelem hiánya.

A lipopoliszaharida (LPS) a Gram-negatív baktériumok külső membránjába ágyazott molekula. Három szerkezeti részre osztható; a külső membránba ágyazott lipid A-ra, az oligoszaharida core-ra és az ismétlődő alegységekből felépülő O-antigénre. Az O-antigén szerkezete alapján a négy *Shigella* faj közel 50 (szub)szerotípusra osztható; 16 *S. flexneri*, 18 *S. boydii*, 13 *S. dysenteriae* és egy *S. sonnei* szerotípust különböztethetünk meg. Jelenlegi adatok szerint a *S. flexneri* 2a, 3a, 6 illetve a *S. sonnei* szerotípusok felelősek a fejlődő országokban előforduló közepes-súlyos hasmenéses shigellózisok 65%-áért. Ezen belül is az endémiás területeken a *S. flexneri* törzsek okozzák a megbetegedések legnagyobb részét, szemben az iparosodott országokkal, ahol a *S. sonnei* törzsek felelősek az esetek 65%-áért. A területenként eltérő és időben folyamatosan változó szerotípus megoszlás miatt olyan vakcinára lenne szükség, mely több – ideális esetben az összes – szerotípus ellen védelmet biztosítana.

A lipopoliszaharida O-antigénje amellet, hogy nagy variabilitást mutat szerkezetileg, erős immunogén. Egy természetes *Shigella* fertőzés során a képződő specifikus ellenanyagok legnagyobb része az O-antigént ismeri fel. Ezek az antitestek, bár bizonyítottan protektívek, a védettség kizárólag a fertőző törzs szerotípusával megegyező (homológ)

törzsekre korlátozódik. Az LPS mellett azonban léteznek további fontos virulencia faktorok a *Shigella* törzsekben. Virulens törzsek hordoznak egy úgynevezett nagy virulencia plazmidot, ami számos virulencia faktort kódol, köztük a baktérium invazivitásáért felelős 3-as típusú szekréciós rendszert (type 3 secretion system, T3SS). Ez egy túszerű fehérje komplex, mely átnyúlik a baktérium belső és külső membránján egészen a felszínig. Ha a 3-as típusú szekréciós rendszer "hegye" érintkezik a célsejt (colon epithel) bazális membránjával, úgynevezett inváziós plazmid antigén B és C (IpaB és IpaC) fehérjék jutnak át a túszerű csatornán és beépülnek a célsejt sejtmembránjába. Ott pórust képeznek, melyen át ~25 bakteriális effektor fehérje jut a gazdasejt citoplazmájába. Ezen effektorok az aktin átrendeződése révén a baktérium bekebelezéséhez vezetnek. Ismételt *Shigella* fertőzés esetén (elsősorban endémiás területeken élőknél) kimutatható az Ipa antigének elleni antitestek megjelenése. Mivel ezen antigének konzerváltak, az ellenük termelt ellenanyagok elméletileg védeltséget biztosítanak más (heterológ) szerotípusú törzsekkel szemben is. Csakhogy, a természetes keresztvédelem hiánya arra utal, hogy az anti-Ipa antitestek nem tudnak a baktérium felszínéhez kötődni, valószínűleg azért, mert az Ipa fehérjék csak akkor jelennek meg a baktériumsejt felszínén, amikor az már a célsejtbe jut.

A jelenlegi klinikai fázisban levő vakcina jelöltek valamennyien O-antigént expresszáló (smooth) invázió törzseken alapulnak. Emiatt a vakcinálás révén kiváltott immunitás általában az adott szerotípusra korlátozódik. Annak eléréséhez, hogy a vakcina több szerotípussal szemben is védelmet biztosítson, több, különböző vakcina törzset kell kombinálni a védőoltásban.

Alternatív megoldást biztosítanak azok az alegység vakcina jelöltek, melyek konzervált *Shigella* antigéneket tartalmaznak. Egy konzervált (minden szerotípus által egyformán expresszált) antigénekből álló vakcina – amennyiben ezen antigének hozzáférhetők a baktérium felszínén - minden *Shigella* törzssel szemben védelmet biztosítana. Genetikailag létrehozott külső membrán partikulumok esetén leírták, hogy védeltséget biztosítottak virulens *Shigella* törzsek ellen az egér tüdő modellben. Bár általánosságban az alegység vakcinák jelentik a legbiztonságosabb védőoltási stratégiát, a magas előállítási költségük meggátolhatja a széleskörű alkalmazást a fejlődő országokban.

A *Shigella* elleni vakcinálási kísérletek történetében a legsikeresebb klinikai vizsgálatot az 1970-es években végezték Romániában. A spontán avirulens *S. flexneri* 2a Istrati T₃₂ törzssel (Vadizen) immunizáltak több mint 30,000 gyermeket és 4,700 felnőttet *per os*. A vakcinálás 78-88%-os védelmet biztosított mind homológ (*S. flexneri* 2a) mind heterológ (*S. sonnei*) fertőzésekkel szemben is, anélkül, hogy súlyos mellékhatásokról számoltak volna be. Az immunitás eléréséhez legalább ötszöri vakcinálásra volt szükség, és a védeltség 6 hónapig tartott. A vakcina törzs genetikai vizsgálata később kimutatta, hogy a törzs egy deletált virulencia plazmidot hordozott, így nem expresszált Ipa fehérjéket és nem volt invázió. Bár ezen korai klinikai vizsgálat nem a manapság elvárt kettős-vak placebo kontrollált vizsgálatok szerint történt, és a leírt heterológ védelem (keresztvédelem) ellentmondott minden korábbi és későbbi vakcina kísérletben megfigyelt eredménynek, a leírt hatékonyság egyedülálló a *Shigella* elleni védőoltás jelöltek körében.

A Vadizen vakcina által biztosított kereszt-védelem alapján azt a hipotézist állítottuk fel, miszerint a “major” felszíni antigén komplexek (Ipa-k) hiánya és/vagy a nem-invazív fenotípus növelheti az immunválaszt a *Shigella* konzervált antigénjei ellen. Annak érdekében, hogy az aleggység vakcináknál olcsóbb, széleskörű védettséget biztosító vakcinálási stratégiát hozzunk létre, élő, attenuált (virulenciájában gyengített) vakcina jelölt törzseket állítottunk elő és karakterizáltunk.

2. Célkitűzések

- 1) Attenuált *Shigella* mutánsok létrehozása célzott mutagenézissel és a virulencia plazmidot nem tartalmazó törzsek szelekciójával.
- 2) A mutáns törzsek virulenciájának vizsgálata *in vitro* és *in vivo* módszerekkel.
- 3) A vakcina jelölt törzsek hatékonyságának vizsgálata heterológ fertőzéssel szemben az egér tüdő modellben.
- 4) Keresztvédelmet biztosító immunsérum által felismert konzervált felszíni *Shigella* antigének azonosítása.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Izogén *Shigella* mutánsok létrehozása

A szekvenált prototípus *S. flexneri* 2a 2457T törzs izogén mutánsait állítottunk elő Red rekombináz technikával, melynek során az inaktiválandó gént a λ Red rekombináz egy antibiotikum kazettára cserélte ki. A rekombináció alapja, hogy az antibiotikum kazetta két végére egy 30-50 bázis hosszúságú szakaszt illesztettünk, ami homológ volt a megcélzott gén két végével. Mind a rekombináz enzimet kódoló plazmidot, mind az antibiotikum kazettát elektroporálás útján juttattuk a baktérium sejtekbe. A mutánsokat ezt követően Congo vörös festéket tartalmazó táptalajon növesztettük, ami lehetővé tette invazív (Congo vörös festéket kötő sötét narancs vagy piros) és nem-invazív (a festéket nem kötő, így fehér vagy halvány rózsaszínű) klónok szelekcióját.

Hasonlóan Congo vöröst tartalmazó táptalajon szelektáltunk fázis I (invazív, O-antigént expresszáló) és fázis II (nem invazív és O-antigént nem expresszáló/rough) *S. sonnei* variánsokat.

Hogy megerősítsük, hogy a nem invazív klónokban a teljes nagy virulencia plazmid hiányzik, PCR-rel ellenőriztük két plazmidon kódolt virulencia gén illetve a plazmid replikációs origójának jelenlétét.

3.2. A *Shigella* mutánsok *in vitro* karakterizálása

A létrehozott mutáns törzsek adhéziós és invazív tulajdonságát HeLa és Int407 sejteken vizsgáltuk. A baktériumokat konfluens sejttenyészethez adtuk úgy, hogy a MOI érték (multiplicity of infection) 10 legyen. A sejtekhez nem kötődő baktériumokat mosással távolítottuk el, majd a sejtek lízisét követően baktérium sejtszám meghatározást végeztünk. Az eredmény a sejthez asszociált baktériumok számát adta meg. Az intracelluláris baktériumok számát hasonlóan határoztuk meg, csak a sejttenyészethez gentamicint adtunk, ami minden extracellulárisan található baktériumot elpusztított, így a sejtlízist követő baktérium szám meghatározása az invazív baktérium számot eredményezte.

A *Shigella* törzsek szérum érzékenységet egészséges egyénekből származó szérumban vizsgáltuk. A baktérium törzsek túlélését 50%-os szérumban való 30-60-120 perces és 24 órás inkubációt követően határoztuk meg. Kontrollként meghatároztuk a törzsek túlélését hővel kezelt (komplement inaktivált) szérumban is.

3.3. Mutánsok vizsgálata az egér tüdő modellben.

6-8 hetes, nőstény, specifikus patogéntől mentes (SPF) BALB/c egereket használtunk az *in vivo* kísérletekhez. Az egereket intraperitoneális anesztéziát követően intranazálisan immunizáltuk vagy fertőztük.

A mutánsok *in vivo* túlélésének vizsgálatához az egereket subletális dózisú baktérium szuszpenzióval fertőztük. A következő négy napon naponta 2-2 egéren végeztünk eutanáziát, majd a tüdejüket homogenizáltuk és abból meghatároztuk a csíraszámot.

A létrehozott vakcina jelölt törzsek attenuáltságát (ezáltal biztonságosságát) az 50%-os letális dózis (LD₅₀) meghatározásával vizsgáltuk. Egerek ötös csoportjait fertőztük különböző csíraszámú baktérium szuszpenzióval, majd 14 napig megfigyeltük túlélésüket. Az LD₅₀ értéket a túlélő egerek számából statisztikai módszerekkel számítottuk ki (Reed és Muench szerint)

Hogy megállapítsuk a vakcina jelölt törzsek hatékonyságát, egereket immunizáltunk subletális csíraszámú baktérium eleggyel egymást követően kétszer, majd két héttel a második immunizálást (boostert) követően megfertőztük őket letális dózisú homológ (azonos szerotípusba tartozó) törzsszel. Az immunizálás hatékonyságát az egerek túlélése alapján határoztuk meg.

Hasonlóképpen a keresztvédelem vizsgálatára az egereket kétszeri immunizálást követően különböző heterológ (más szerotípusba tartozó) törzsekkel fertőztük. A túlélést és az egerek súlyvesztését megfigyelve állapítottuk meg a védettséget.

A túlélési görbék statisztikai elemzéséhez a LogRank (Mantel-Cox) tesztet használtuk.

Immunszérumot gyűjtöttünk az immunizált egerekből egy héttel a booster immunizálást követően. Bronchusmosó folyadék (BAL) vétele 2 héttel a második immunizálást követően történt az eutanizált egerek tracheájának kanulálásával.

3.4. ELISA

Az immunizálás hatására a vérben és a bronchusmosó folyadékban megjelenő antitestek szintjét ELISA vizsgálattal határoztuk meg. A lemezek érzékenyítéséhez élő baktériumokat használtunk és a specifikus szérum IgG, IgG1 és IgG2a valamint a BAL IgA antitesteket HRPO konjugált másodlagos antitestek segítségével detektáltuk.

3.5. Lehetséges keresztvédelmet biztosító antigének azonosítása

An immunszérum által felismert antigének azonosításához a szérumokat baktériumok lizátumával reagáltattuk, majd a létrejött immunkomplexeket protein G gyöngyökkel kötöttük meg. A megkötött antitesteket és antigéneket leválasztottuk a gyöngyökről és poliakrilamid gélelektroforézissel szeparáltuk el egymástól. Azon fehérjéket, melyeket kizárólag az immunszérummal detektáltunk (összehasonlítva naiv kontroll egerek szérumával) a gélből kivágva tömegspektroszkópiával azonosítottunk. A tömegspektroszkópos azonosítás kollaboráció útján, Hunyadi-Gulyás Éva, a Magyar Tudományos Akadémia Fehérje Kutató Csoportja tagjának segítségével történt.

4. Eredmények

4.1. Élő attenuált vakcina jelölt törzsek létrehozása és karakterizálása

A prototípus *S. flexneri* 2a 2457T törzs izogén attenuált mutánsait hoztuk létre az *aroC* illetve az *rfbF* gének deléciójával. Az *aroC* gén inaktiválása auxotróf mutánst eredményezett, mely törzs bizonyos aromás aminosavak szintézisére képtelen, így *in vivo* nem szaporodik. Az *rfbF* gén deléciójával O-antigént nem expresszáló, rough mutánst hoztunk létre. Emellett szelektáltuk ezen mutánsoknak Congo vörös festéket nem kötő (Congo vörös negatív, CRN) nem invazív variánsait, melyek nem tartalmazták az úgynevezett nagy virulencia plazmidot, így az inváziós plazmid antigéneket (Ipa) sem. *S. sonnei* 598 törzs fázis II formáját is izoláltuk, mely az inváziós plazmid elvesztésével nem csupán nem invazív, de O-antigént sem expresszál. A virulencia plazmid elvesztését megerősítettük PCR-rel is. A törzsek fenotípusos jellemzőit az 1. táblázatban gyűjtöttük össze.

1. táblázat *Shigella* mutáns törzsek fenotípusos jellemzői

Törzs	O-antigén	Virulencia plazmid (Ipa)
<i>S. flexneri</i> 2a 2457T	+	+
2457T Δ <i>aroC</i> CRP	+	+
2457T Δ <i>aroC</i> CRN	+	-
2457T Δ <i>rfbF</i> CRP	-	+
2457T Δ <i>rfbF</i> CRN	-	-
<i>S. sonnei</i> 598 fázis I	+	+
<i>S. sonnei</i> 598 fázis II	-	-

4.2. Vakcina jelölt mutánsok *in vitro* tulajdonságainak vizsgálata

HeLa és Int407 sejteken bizonyítottuk, hogy minden Congo vörös festéket kötő (CRP) mutáns törzsünk képes ezen sejtek inváziójára. Ezzel szemben a Congo vöröset nem kötő formákat nem lehetett intracellulárisan kimutatni, ami megerősítette nem invazív tulajdonságukat. Bár az O-antigént nem expresszáló mutáns törzsek, illetve a nem invazív törzsek esetén is megfigyeltünk fokozott sejtadhéziót, a különbség ezen törzsek és a vad törzs között statisztikailag nem volt szignifikáns.

A prototípus *S. flexneri* 2a 2457T törzs, valamint izogén mutánsai egyaránt szérumban érzékenyek bizonyultak. Aktív komplement jelenlétében a törzsek 60 perc után elpusztultak, miközben hővel inaktivált komplement mellett a törzsek túléltek, sőt szaporodtak a szérumban. Ezzel szemben a *S. sonnei* fázis I törzset szérumban rezisztensnek találtuk 5 különböző donor szérumával szemben is. A fázis I formával ellentétben a fázis II mutáns már 30 perc inkubációt követően elpusztult ezen donorok szérumában. Ez alapján megerősítettük, hogy *S. sonnei* törzsben az O-antigén és/vagy az inváziós plazmid elvesztése csökkenti a szérumban rezisztenciát.

4.3. A *Shigella* vakcina jelöltek *in vivo* túlélése, virulenciája és hatékonysága

Hogy meghatározzuk az általunk létrehozott mutánsok attenuáltságának (virulencia csökkentésének) mértékét, meghatároztuk a törzsek 50% letális dózisát. Ez az a csíraszám, ami mellett a kísérleti állatok fele pusztul el. A kísérletek során kimutattuk, hogy míg az invazív $\Delta aroC$ és $\Delta rfbF$ mutánsok csak minimális attenuációt mutattak a vad típusú törzshöz képest, addig a nem invazív törzsek esetén nem volt halálozás az egereknél még a legmagasabb (10^8 illetve $10^{7,5}$ csíra) dózisonál sem. Ez alapján a nem invazív mutánsok egészben teljesen avirulensek.

A vakcina törzsek hatékonyságának megállapításához az azokkal immunizált egereket letális dózissal homológ (a vakcina törzssel megegyező szerotípusú) vagy heterológ (a vakcina törzstől különböző szerotípusú) törzsekkel fertőztük.

Amint az az irodalmi adatok alapján várható volt, az O-antigént expresszáló törzsek ($\Delta aroC$) mind invazív, mind nem invazív formában szignifikáns, 40%-os védelmet biztosítottak a homológ törzssel szemben. Meglepő módon az O-antigént nem expresszáló mutánsok ($\Delta rfbF$), még ennél is magasabb, 80%-os védeltséget biztosítottak, ami szintén független volt az immunizáló törzs invazivitásától.

Heterológ, *S. flexneri* 6 törzssel való fertőzéssel szemben, az $\Delta aroC$ mutánsok nem biztosítottak immunitást, ami jól tükrözi a természetes *Shigella* fertőzést követő keresztvédelem hiányát. Azonban az O-antigént nem expresszáló $\Delta rfbF$ törzsekkel való immunizálás (mind invazív, mind nem invazív formában) a kísérleti állatok szinte teljes védelmét eredményezte. A törzsek heterológ szerotípusokkal szemben mutatott hatékonyságát tovább vizsgáltuk egy másik fertőző törzs (*S. sonnei*) alkalmazásával. Ismételtén az O-antigént expresszáló invazív törzssel való immunizálás ismételtén hatástalannak bizonyult a heterológ törzssel szemben, és ezekben a kísérletekben az invazív O-antigént expresszáló törzs sem

biztosított védelmet. Azonban a nem invazív rough törzs (dupla mutáns) szinte teljes védettséget biztosított három független kísérletben.

Annak érdekében, hogy eredményeinket, miszerint egy nem invazív, O-antigént nem expresszáló törzs hatékony lehet heterológ fertőzések ellen megerősítsük, fázis I és fázis II *S. sonnei* törzsekkel immunizáltunk egereket. Míg a fázis I törzs hatástalan volt heterológ törzsekkel szemben (két különböző fertőző törzset vizsgáltunk), addig a fázis II, tehát nem invazív rough dupla mutáns *S. sonnei* törzs szignifikáns védelmet biztosított.

Bizonyítani tudtuk továbbá, hogy a dupla mutánsok jobb hatékonysága nem a mutáns törzsek hosszabb *in vivo* túléléséből adódik, vagyis nem egy tartósabb immunstimulus eredménye. Míg az O-antigént expresszáló invazív törzs még a fertőzést követő 4. napon is jelen volt az egerek tüdejében, addig az O-antigént nem expresszáló, nem invazív mutáns már 24 órával a fertőzést követően sem volt kimutatható a tüdőből.

4.4. *Shigella* specifikus antitestek megjelenése a vakcina jelöltekkel való immunizálást követően

Az immunizált egerek szérumában és bronchusmosó folyadékában megjelenő *Shigella* specifikus antitestek vizsgálatával az volt a célunk, hogy tisztázzuk a dupla mutánsok keresztvédelmet biztosító hatásának mechanizmusát. Eredményeink alátámasztották, hogy a rough, nem invazív törzsszel való immunizálás során fokozott az immunválasz a „minor” (nem O-antigén és nem Ipa) antigének ellen. Továbbá a dupla mutánssal való immunizálással megnő az IgG2a izotípusba tartozó antitestek aránya, ami fokozott Th1 irányú immunválaszra utal.

4.5. Lehetséges kereszt-védelmet biztosító konzervált antigének azonosítása

Tömegspektroszkópia segítségével azonosítottuk a dupla mutáns ellen képződött antitestek specificitását. Három független immunizálásból származó szérummal következetesen azonosítottuk a külső membrán fehérje C-t (outer membrane protein C, OmpC), a bifunkcionális acetaldehid-CoA/alkohol dehidrogenázt, a glicin dehidrogenázt és a dihidrolipoamide acetiltransferázt. Ezen fehérjék közül egyedül az OmpC fehérjéről ismert, hogy a külső membránban helyezkedik el, a másik három enzim valószínűleg a baktérium citoplazmájában található.

5. Megbeszélés

A jelenlegi védőoltási stratégiák (általánosságban és *Shigella* ellen is) általában a patogének fő antigénjein alapulnak. Azonban ezen antigének, a nagy evolúciós nyomás következtében kifejezetten változatosak, több formájuk alakult ki. Általában ezen fő antigén változatok képezik a patogének szerotípusba való sorolásának alapját. Másrésről a különböző szerotípusú törzsek számos, konzervált antigént is expresszálnak. A tény, hogy ezen antigének konzerváltak maradhattak arra utalhat, hogy a fehérjék antitestek számára nem elérhetők a felszínen, vagy arra, hogy olyan lényeges funkciót látnak el, ami nem teszi lehetővé szerkezeti módosításukat.

Shigella fertőzést követően kimutatták, hogy a termelődő antitestek legnagyobb része az O-antigén és az inváziós plazmid antigének (Ipa-k) ellen irányul. Mivel az Ipa elleni antitestek nem protektívek és az O-antigén nagyfokú szerkezeti változatosságot mutat közel 50 különböző variánssal, a fertőzés után fennmaradó immunitás csak az azonos szerotípusú törzsek ellen nyújt védelmet. Munkánk során azt az elméletet állítottuk fel, miszerint az immunodomináns antigének jelenléte mintegy elvonja az immunválasz figyelmét az esetleges konzervált, keresztvédelmet biztosító antigénekről. Hogy feltételezésünket alátámasszuk olyan *Shigella* mutánsokat hoztunk létre, melyek sem O-antigént, sem inváziós plazmid antigéneket nem expresszálnak (dupla mutáns). Bizonyítottuk, hogy mind a *S. flexneri* 2a 2457T, mind a *S. sonnei* 598 törzsből származó dupla mutáns avirulens az egér tüdő modellben, a fertőzött egereknél nem tapasztaltuk megbetegedés jeleit még a legnagyobb vizsgált dózis esetén sem. Továbbá a virulencia plazmid elvesztésével a fázis II. *S. sonnei* törzs elvesztette a fázis I. variánsnál megfigyelt szérumszintet is. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a nem invazív rough mutánsok nagymértékben attenuáltak és így valószínűleg biztonságos vakcina törzsek lehetnek.

További vizsgálatokkal demonstráltuk, hogy a dupla mutáns 2457T $\Delta rfbF$ CRN törzssel való immunizálás nem csak a homológ (azonos szerotípusú) fertőzéssel szemben biztosított szignifikáns védelmet, de a kísérleti állatok szinte teljes védettséget mutattak két heterológ (különböző szerotípusú) törzssel szemben is. Továbbá a keresztvédelmet megerősítettük a dupla mutáns fázis II. *S. sonnei* törzssel is; teljes védelmet biztosított 90%-ban letális dózisú *S. flexneri* 6 fertőzéssel szemben, és *S. flexneri* 2a fertőzés során az immunizált egerek szignifikánsan alacsonyabb súlyvesztést mutattak (megbetegedés mértéke alacsonyabb volt), mint a kontroll, illetve a fázis I variánssal immunizált egerek.

Immunológiai vizsgálatokkal bizonyítottuk, hogy a dupla mutánsok által biztosított keresztvédelem valószínűleg abból következik, hogy az ezen törzsekkel való immunizálás fokozott immunválaszt vált ki a nem O- és nem inváziós plazmid antigénekkal szemben (minor antigének). A termelt antitestek eltérő specifitása mellett különbség volt az antitestek izotípus megoszlásában is, a dupla mutáns ellen termelt immunglobulinok nagyobb arányban voltak IgG2a típusúak, míg a smooth, invazív törzs ellen termelt IgG-k elsősorban az IgG1 osztályba tartoztak. Ezen eredmény alapján feltételezzük, hogy a specifikus antitestek izotípusa fontos tényező lehet a fertőzéssel szembeni védelem kialakításában.

Célunk volt a keresztvédelmet biztosító antigének azonosítása: a külső membrán fehérje OmpC mellett három független kísérletben is azonosítottunk három, feltehetően citoplazmában elhelyezkedő enzimet. Mivel a protektív antitestek felszíni antigénekhez kötődnek, feltételezhető, hogy a három intracelluláris enzim nem játszik szerepet a keresztvédelem kialakításában. Bár léteznek irodalmi adatok arra is, hogy metabolikus enzimek megjelenhetnek a baktériumok felszínén és specifikus ellenanyagok célpontjává válhatnak. Ezen fehérjék szerepének tisztázása további vizsgálatokat igényel.

Eredményeink alapján úgy véljük, hogy a fő immunodomináns antigéneket nem expresszáló *Shigella* mutánsok ígéretes keresztvédelmet biztosító vakcina jelöltek.

6. Új eredmények

- 1) Sikeresen létrehoztunk számos attenuált *Shigella* mutánst célzott mutagenezissel.
- 2) Munkánk során kimutattuk, hogy az O-antigént nem expresszáló és nem invazív *Shigella* dupla mutánsok avirulensek in vitro és az egér tüdő modellben is, ezért biztonságos vakcina jelölteknek tekinthetők.
- 3) Több különböző heterológ törzssel szemben is igazoltuk, hogy ezen dupla mutánsok szignifikáns, olykor szinte teljes keresztvédelmet biztosítanak.
- 4) Eredményeink alapján a keresztvédelem feltehetően annak a következménye, hogy a fő immunodomináns antigéneket (major antigének) nem expresszáló törzsekkel immunizálva fokozódik az egyéb, minor antigénekkal szembeni immunválasz és megváltozik a specifikus antitestek izotípusának megoszlása.
- 5) A lehetséges keresztvédelmet biztosító konzervált antigének azonosítása során eredményeink az OmpC fehérje szerepét valószínűsítik, illetve felmerült a lehetősége annak, hogy metabolikus enzimek elleni antitestek is szerepet játszanak az immunitás kialakításában.

7. Közlemények listája

Az értekezés alapjául szolgáló közlemény:

Szijártó V, Hunyadi-Gulyás E, Emődy L, Pál T, Nagy G. Cross-protection provided by live *Shigella* mutants lacking major antigens. *Int J Med Microbiol* **2013 May**; 303(4):167-75. (IF: **4.173**)

Egyéb közlemények:

Schneider G, Dobrindt U, Middendorf B, Hochhut B, **Szijártó V**, Emődy L, Hacker J. Mobilisation and remobilisation of a large archetypal pathogenicity island of uropathogenic *Escherichia coli* in vitro support the role of conjugation for horizontal transfer of genomic islands. *BMC Microbiol* **2011**; 11:210. (IF: 3.04)

Szijártó V, Pál T, Nagy G, Nagy E, Ghazawi A, al-Haj M, El Kurdi S, Sonnevend Á.. The rapidly emerging ESBL-producing *Escherichia coli* O25-ST131 clone carries LPS core synthesis genes of the K-12 type. *FEMS Microbiol Lett* **2012 Jul**; 332(2):131-6. (IF: 2.044)

8. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni mindazok támogatását, akik a munkám során segítettek.

Elsősorban köszönöm témavezetőmnek, Dr. Nagy Gábornak és a doktori iskola vezetőjének Professzor Emődy Leventének a kimeríthetetlen segítséget és támogatást és hogy kiemelkedő példát mutatnak mind szakmai, mind emberi hozzáállásból.

Hálás vagyok kollégáimnak és barátaimnak, Lajkó Rózsának, Dorn Ágnesnek, Kovács Juditnak, Dr. Melegh Szilviának, Dr. Kovács Beátának és Dr. Péterfi Zoltánnének, akikkel felejthetetlen másfél évet töltöttünk együtt a laborban. Nagy élmény volt a közös munka és mindig számíthattam a segítségükre, legyen szó megszámlálhatatlan pipettás doboz feltöltéséről, vagy az egerek súlyának méréséről vasárnaponként.

Továbbá szeretném megköszönni az Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézet valamennyi dolgozójának a támogatását, különösképpen Dr. Schneider Györgynek, Dr. Kerényi Mónikának, Dr. Kocsis Bélának és Kovács Évának, hogy számos tudományos és gyakorlati kérdésben nyújtottak segítséget. Ha kérésről volt szó, sohasem hallottam senkitől sem, hogy „nem”, vagy „lehetetlen”.

Köszönettel tartozom barátaimnak, elsősorban Dr. Osztovitsné Dr. Engel Borbálának, hogy mindig bízhattam támogatásában barátságunk 16 éve alatt. Példás élete útmutatás számomra.

Legvégül szeretném megköszönni a számomra legfontosabb személyeknek, a családomnak szeretetüket és támogatásukat. Édesanyámnak, Édesapámnak, Adrinak, Andrisnak, nagynénéimnek és nagybátyáimnak valamint unokatestvéreimnek, hogy olyan szeretetteljes környezetet biztosítottak számomra, amiben a legjobbat hozhatom ki magamból. Végezetül szeretném megköszönni két hihetetlenül erős asszonynak, a nagymamáimnak el nem múló szeretetüket.