

dc\_1937\_21

# ***Chlamydia* fajok és a cytomagalovírus okozta fertőzések jellemzői és megelőzésük lehetőségei**

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Burián Katalin

Szegedi Tudományegyetem Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar  
Orvosi Mikrobiológiai Intézet



Szeged

2021

dc\_1937\_21

## Tartalom

1.	Bevezetés.....	2
1.1.	<i>C. trachomatis</i> .....	2
1.2.	<i>C. muridarum</i> .....	3
1.3.	A <i>C. trachomatis</i> és a <i>C. muridarum</i> ellen irányuló sejt-autonóm immunitás.....	3
1.4.	<i>C. pneumoniae</i> .....	4
1.5.	Chlamydia okozta fertőzések megelőzésének lehetőségei .....	4
1.6.	A humán cytomegalovírus (HCMV) .....	5
2.	A kísérletek során alkalmazott módszerek .....	7
3.	Célkitűzések.....	15
4.	Eredmények és megbeszélés .....	16
4.1.	A különböző <i>Chlamydia</i> fajok által okozott infekciókat és reinfekciókat kísérő immunológiai változások a gazdaszervezetben .....	16
4.2.	A chlamydiák szerepe krónikus betegségekben .....	19
4.3.	Az IFN- $\gamma$ szerepe a chlamydia fertőzésekben .....	20
4.4.	A chlamydiák okozta fertőzések megelőzésének lehetőségei .....	24
4.5.	A chlamydiák okozta fertőzések terápiájának lehetőségei és a szaporodásukat befolyásoló tényezők .....	27
4.6.	A CMV fertőzést kísérő celluláris és humorális immunválasz .....	29
5.	Az értekezés új megállapításai.....	31
6.	Köszönetnyilvánítás .....	33
7.	Az értekezés alapját képező <i>in extenso</i> közlemények .....	33
7.1.	Egyéb <i>in extenso</i> közlemények.....	36

## 1. Bevezetés

A *Chlamydiaceae* család *Chlamydia* genusában fontos humán patogén fajok találhatóak, ezek a *C. trachomatis*, a *C. pneumoniae* és a *C. psittaci*. A *C. trachomatis*-nak két biovariánsa van, az egyik az oculogenitális, más néven TRIC (trachoma and inclusion conjunctivitis), ebbe a csoportba tartoznak a trachoma okozói, a *C. trachomatis* A, B, Ba, C, valamint a *C. trachomatis* D-K szerovariánsok, melyek a genitális fertőzésekért felelősek. A másik biovariáns az LGV (lymphogranuloma venereum), ebbe a csoportba soroljuk a *C. trachomatis* L1-L3 szerovariánsait, melyek a lymphogranuloma venereum nevű kórképet okozzák. A *C. pneumoniae* a közösségben szerzett pneumoniák egy részében mint kórokozó mutatható ki, továbbá széleskörű kísérletek folynak az atherosclerosisban, valamint más krónikus kórképekben betöltött szerepének tisztázására.

A *Chlamydia* genus tagjai Gram szerint negatívan festődő, obligát intracelluláris, baktériumok. Jellemző bifázisos fejlődési cikluson mennek keresztül a gazdasejtben. A spóraszerű elemi test (EB), mely metabolikusan inaktív és fertőzőképes, a sejtbe phagocytosis révén jut be. Az endosomában levő EB megakadályozza a phagolysosoma kialakulását és egy inklúzióban folytatja fejlődését, ahol metabolikusan aktív retikuláris testté (RB) alakul, amely a gazdasejt anyagait és energiaforrásait felhasználva zárványban szaporodik bináris hasadással. Az RB-k általában 8-12 osztódáson mennek keresztül, majd aszinkron módon átalakulnak EB-vé.

### 1.1. *C. trachomatis*

A *C. trachomatis* A, B, Ba és C szerovariánsok okozzák a trachomát, a conjunctiva gyulladással megbetegedését, amely kezelés hiányában vaktságot eredményezhet. A WHO becslése szerint a *C. trachomatis* ezen típusaival kb. 40 millió ember fertőzött a világon, és mintegy 1,3 millió ember veszítette el látását a fertőzés következtében. Napjainkban a *C. trachomatis* D-K okozta genitális fertőzés a leggyakoribb szexuális úton terjedő bakteriális fertőzés az USA-ban és a többi fejlett országban egyaránt. A chlamydia még fontosabb a fejlődő országokban, a WHO becslései szerint globálisan 92 millió nemi úton terjedő fertőzés fordul elő évente, és a legtöbb fertőzés a világ legszegényebb részein alakul ki, ahol a kontroll programok gyakorlatilag teljesen hiányoznak. A *C. trachomatis* az epithelium egyrétegű hengerhámsejtjeit fertőzi meg, nők esetén az endocervixet, illetve férfiaknál az urethrát, ami nőkben mucopurulens cervicitishez, férfiakban pedig nem-gonococcális urethritishez vezethet. A helyi gyulladás ellenére a *C. trachomatis* fertőzések a nők 70-90%-ában, és a férfiak 30-50%-ában szubklinikusan zajlanak. A kezeletlen nőkben a fertőzés továbbterjed az endometriumon át a petevezetékerekre, és krónikus kismencedei gyulladáshoz (PID), méhen kívüli terhességhez, infertilitáshoz vezet. A természetes *C. trachomatis* fertőzésre kialakult immunválasz nem komplett, valószínűleg a kórokozó számos az immunrendszert elkerülő mechanizmusa miatt. A protektív immunitáshoz a T-sejtek, különösen az MHC-II korlátozott CD4<sup>+</sup> T-sejtek szükségesek. Ezenfelül a T helper1 (Th1) cytokinek, különösen az IFN- $\gamma$  és az interleukin-12 (IL-12) szerepe elengedhetetlen a protektív válasz kialakításában. Az LGV-t a *C. trachomatis* L1-L3 típusai okozzák. Korábban ezen megbetegedés szinte nem fordult elő a fejlett országokban, viszont a fejlődő országokban endémiás volt. Az utóbbi évtizedekben először holland kutatók, majd világszerte beszámoltak a *C. trachomatis* L törzseinek felbukkanásáról a homoszexuális férfiak körében.

### 1.2. *C. muridarum*

A *C. muridarum* (korábban *C. trachomatis mouse pneumonitis* (MoPn)) egy egér patogén, melyet eredetileg egér tüdőből izoláltak, és csak az utóbbi időkben szolgál a humán genitális fertőzések egér modelljéül. A *C. muridarum* és a *C. trachomatis* D szerovariánsa meglepően nagy hasonlósággal rendelkeznek a géntartalom és -sorrend tekintetében. A triptofán operon jelenléte a *C. trachomatis*-ban és hiánya a *C. muridarum* genomjában nagyon fontos különbség a két biotípus között, ami eltérő szenzitivitást eredményez az IFN- $\gamma$ -val szemben. A genetikai hasonlóságon túlmenően, a *C. muridarum* okozta genitális fertőzés utánozza a *C. trachomatis* fertőzés nőknél okozta képét. A *C. muridarum* intravaginális inokulációja a vaginális és a cervicális epithel sejtek önlimitáló fertőzését eredményezi, mely a későbbiek során, a hámréteg felületén terjedve felszálló fertőzést okozhat az uterus szarvában, valamint a petevezetőkben. A gyógyulás kb. 4 hetet vesz igénybe, és hosszú távú adaptív immunitást eredményez, mely többnyire védő hatású az ismételt fertőzésekkel szemben.

Ezzel ellentétben a *C. trachomatis* D-K okozta fertőzés kimenetele egérben nagymértékben függ az alkalmazott egértörzstől. A C57BL/6N és C57BL/10 egerek nagyfokú rezisztenciát mutatnak, még akkor is, ha nagy a fertőző dózis. A kialakult klinikai képre jellemző az alacsony számú baktériumürítés, minimális gyulladás, nem jellemző a hydrosalpinx kialakulása, és a reinfekciók során csak néhány napig lehet kimutatni a kórokozót. Az a tény, hogy a *C. trachomatis* fertőzést a természetes immunitás képes felszámolni, önmagában nem jelenti azt, hogy haszontalanok lennének a *C. trachomatis* szerovariánsokkal létrehozott genitális fertőzés modellek és a vakcina fejlesztések. A rendelkezésre álló tudás a humán genitális fertőzések természetes lefolyásáról és a protektív válaszról hiányos, mivel a betegség diagnózisa kötelező kezelést parancsol. Napjainkban még nem áll rendelkezésre olyan állatmodell, amely tökéletesen utánozná a humán fertőzés klinikai képét. A *C. trachomatis*-szal végzett vakcina kísérletek azt mutatják, hogy a kialakult adaptív immunválasz bizonyos fokú védelmet biztosít a fertőzéssel szemben, ami alátámasztja a *C. trachomatis* használatát egerekben vakcina kísérletek során.

### 1.3. A *C. trachomatis* és a *C. muridarum* ellen irányuló sejt-autonóm immunitás

Az egér modellek a leggyakrabban használt modellek a vakcinák fejlesztésében, de az emberi és az egér immunrendszer közötti különbségek, beleértve az úgynevezett sejt-autonóm immunitást, megnehezítik az összehasonlítást az egér és az ember között. A sejtek autonóm immunitása a gazdasejtek belső tulajdonsága, amely olyan védelmi mechanizmusokat indít, amelyek megakadályozzák az intracelluláris patogének szaporodását. A védelemben szerepet játszó gének általában indukálhatók, a legfontosabb indukáló citokin az IFN- $\gamma$ . Korábban már leírták, hogy az emberi sejtekben az intracelluláris anti-chlamydiás védekező mechanizmus az IFN- $\gamma$  által indukált indolamine-2,3 dioxygenase (IDO), amely az intracelluláris triptofán készlet degradálásához és így végül a triptofán-auxotroph *C. trachomatis* halálához vezet. Az eliminációs mechanizmus *in vitro* hatékony mind a humán *C. trachomatis*, mind a genetikailag közeli rokon egér chlamydia faj, a *C. muridarum* esetén. Ezzel szemben az *in vitro* adatok azt mutatták, hogy az IDO nem indukálható chlamydia fertőzéssel és/vagy IFN- $\gamma$  kezeléssel egér hámsejtekben. Az IFN- $\gamma$ -val kezelt és a chlamydiával fertőzött egér hámsejtek microarray elemzése rámutatott, hogy ehelyett az IFN- $\gamma$  által indukálható gazdasejti GTPázok tehetőek felelőssé emberi chlamydia törzsek fejlődési ciklusának megzavarásáért. Az egér chlamydia törzs kifejlesztett olyan mechanizmus(ok)at, amelyek inaktíválják a GTPáz választ, és ezt az eliminációs mechanizmust hatástalanná teszik. Ennek ellenére a *C. muridarum* törzs gyorsan

eliminálódik az egér cervicovaginális traktusából, így az egerekben még ismeretlen eliminációs mechanizmusok működnek, amelyek *in vivo* hatásosak az egér chlamydia törzsekkel szemben.

#### 1.4. *C. pneumoniae*

A szekvencia analízissel azonosított *C. pneumoniae* gének nagyon hasonlóak a *C. trachomatis* és a *C. psittaci* strukturális, funkcionális és immunológailag fontos fehérjéket kódoló génjeihez. A *C. pneumoniae* fertőzés ubikviter, a specifikus ellenanyagok 20 éves korra már kimutathatók a populáció 50%-ában, 60-70 éves korra a szeropozitivitási arány eléri a 70-80%-ot. Az általa leggyakrabban okozott megbetegedések a közösségben szerzett pneumonia (CAP), pharyngitis, sinusitis és krónikus bronchitis. A tudományos beszámolók alapján a *C. pneumoniae* a CAP esetek 6-20%-áért tehető felelőssé, bár ezek az adatok nagyrészt szerológiai teszteken alapulnak. A fertőzés klinikai lefolyása nagyon változatos: az enyhe, önmagától gyógyuló betegségtől a súlyos pneumoniáig terjed.

A *C. pneumoniae* okozta fertőzés pathomechanizmusa még nem teljesen tisztázott. Az első tanulmány még 1988-ban jelent meg, melyben beszámoltak a *C. pneumoniae* atherosclerosisban betöltött esetleges szerepéről. Ezt az összefüggést alátámasztották szeroepidemiológiai, immunhisztokémiai, PCR és elektronmikroszkópos vizsgálatok, valamint a patogén kitenyésztése a koszorúerekből. Korábbi állatkísérleteink során normokoleszterinémiás BALB/c egerekben *murin cytomegalovírus* (MCMV) fertőzést követően időlegesen gyulladós fókuszok alakultak ki az egerek aortaívében. A gyulladós góccok egy része később előrehaladott lézióvá fejlődött. Az MCMV által indukált korai elváltozásokat az aortaívben szignifikánsan súlyosbította az egerek későbbi *C. pneumoniae* fertőzése. Az állat modellek, amelyek segítenek tisztázni az atherosclerosis kialakulásának lépéseit és okait, fontos szerepet játszanak a lipidszint-csökkentő gyógyszerek mellett az új gyógyászati készítmények kutatásában. A normál egerekben nem alakul ki atherosclerosis, és az atherogenesis indukálásához hosszú, zsírtartalmú étrend alkalmazása szükséges. Vannak azonban jól bevált, genetikailag módosított beltenyésztett egértörzsek, amelyek lehetővé teszik az atherosclerosis kialakulásának vizsgálatát egérmodellekben (ApoE hiányos (ApoE<sup>-/-</sup>), az LDL receptor-hiányos (LDLR<sup>-/-</sup>) és humán apoB100 transzgenikus egerek. Az ApoE<sup>-/-</sup> egerekben a lipidprofil azonban különbözik attól, amelyet a legtöbb embernél észlelnek az atherosclerosisban; azaz az apolipoprotein (apo) B48-tartalmú LDL-plazmaszintjük magas, az apoB100-tartalmú LDL-szint helyett, ami a hiperkoleszterinémiában szenvedő emberek esetében a jellemző. Az ApoB100only (ApoB100/100)/LDLR<sup>-/-</sup> egér törzs egy mutáns apoB gént hordoz, mely gátolja az apoB48 expresszióját, utánozva a humán viszonyokat. Az LDLR hiány megakadályozza az apoB100-tartalmú LDL felvételét a szövetekben, ami magas plazmaszintű apoB100-tartalmú koleszterolban gazdag LDL-t eredményez. Az ezen egér törzs megalkotói ezeket az egereket az emberi familiáris hiperkoleszterinémia hiteles modelljének tartják. Az ApoB100only/LDLR<sup>-/-</sup> egereket eddig még nem használták modellként a *C. pneumoniae* fertőzés az atherosclerosis progressziójára gyakorolt hatásainak vizsgálatában.

#### 1.5. Chlamydia okozta fertőzések megelőzésének lehetőségei

Bár a chlamydia vakcina kutatásnak hosszú története van, az utolsó humán vakcina kísérletet csaknem 50 éve végezték. A chlamydia elleni vakcináció kezdeti megközelítése teljes mértékben az empirikus, Pasteur által lefektetett elven alapult: "attenuálni vagy inaktíválni és beadni". Először attenuált vakcinákkal próbálkoztak. Az előállításukra a chlamydiát sorozatosan sejt kultúrán passzálták, ami természetes mutációkhoz, majd emiatt a baktérium gyengüléséhez vezetett. Az attenuált vakcinák előnye abban rejlik, hogy stimulálják mind a humorális, mind pedig a celluláris immunválaszt, és a

természetes fertőzést utánozzák. A hátrányukként róható fel, hogy a vakcinációt követően az élő szervezetben visszamutálódhatnak az eredeti, virulens törzssé, mely fertőzést vagy akár perzisztenciát is kialakíthat, ezt követően pedig ez a törzs cirkulálhat a népesség körében. További hibája, hogy olyan antigéneket tartalmaz, amelyek a természetes fertőzés lefolyását súlyosbíthatják. Mivel az élő vakcinák nem bizonyultak biztonságosnak, a kutatók inaktivált oltóanyagokkal próbálkoztak. Az inaktivált vakcináknak is van azonban számos hátránya, így pl. endotoxint tartalmazhatnak, végzetes mellékhatásai lehetnek vagy pedig a védőhatással nem rendelkező komponensei gyengíthetik az immunválaszt. A legfontosabb hátránya, hogy nem replikálódik, így a megfelelő immunválasz fenntartásához ismételt vakcina, és adjuváns adása szükséges. A replikációs képesség hiánya egy másik fontos következményhez vezet, bár indukálja a humorális immunválaszt, a celluláris immunválaszt stimuláló hatása csekély. A teljes organizmust tartalmazó vakcinák mellékhatásainak elkerülésére aleggység vakcina kifejlesztése vált szükségessé. Az aleggység vakcinák biztonságosak, nem tartalmaznak élő patogént, mely visszaalakulhatna virulenssé, és nem tartalmaznak olyan antigéneket, amelyek fokoznák az immunopathológiai folyamatokat és a gyulladást. Az aleggység vakcinák tartalmazhatnak tisztított, rekombináns vagy szintetizált fehérjét, nukleinsavat. A protein alapú aleggység vakcináknak is vannak hátrányai, hasonlóan az inaktivált vakcinákhoz, kevésbé indukálják a celluláris immunválaszt, ami a chlamydia esetében, lévén intracelluláris patogén, igen fontos lenne, valamint adjuvánt igényelnek a hatásuk kialakításához. A korábbi chlamydia vakcinációs kísérletek eredményeit és hátrányait szem előtt tartva úgy döntöttünk, hogy kísérleteink során az általunk rekombináns úton előállított chlamydia proteinek hatékonyságát tanulmányozzuk egér modellben.

#### **1.6. A humán cytomegalovírus (HCMV)**

A HCMV, hivatalos nevén a *humán herpesvírus 5*, a herpesvírus család, betaherpes vírus alcsaládjának a tagja. A herpesvírusok, duplaszálú, lineáris DNS tartalmú, ikozahedrális kapszid szimmetriát mutató, burokkal rendelkező vírusok. A herpesvírusok világszerte előfordulnak, a velük szembeni szeropozitivitás aránya, a HHV8 kivételével, meglehetősen magas. A herpesvírus specifikus ellenanyagok kimutathatók a legelszigeteltebb népcsoportokban, pl. a brazíliai esőerdőkben élő törzsekben is. A herpesvírusok okozta primer fertőzés általában tünetmentes, viszont a hosszú közös evolúciónak köszönhetően a vírusok olyan, az immunrendszert elkerülő mechanizmusokat dolgoztak ki, hogy a szervezet nem képes az eliminációjukra. A herpesvírusok univerzális tulajdonsága a látencia, vagyis a primer fertőzést követően a vírus valahol meghúzódik a gazdaszervezetben és minimális aktivitást mutat. A herpesvírusok egy részénél a látencia helye pontosan definiálható, pl. a *herpes simplex 1* esetében a trigeminalis ganglion, viszont a HCMV többféle sejttípusban, így a mononucleáris sejtekben, a nyálmirigy sejtjeiben, vagy a vesetubulusokban is képes a látencia kialakítására. A HCMV a fennálló celluláris és humorális immunitás ellenére is képes reaktiválódni immunkompetens egyénekben is, általában tünetmentesen. Az ismétlődő reaktivációt az egyénekben folyamatosan mérhető, magas, vírus specifikus IgG szint, valamint az állandó memória CTL szám is jól tükrözi. A reaktiválódás viszont súlyos megbetegedésekhez, halálhoz vezethet immunkompromittált személyekben. A herpesvírusok, így a HCMV fertőzés elleni védelemben is a celluláris immunválasz intaktsága elengedhetetlen. A későbbi fertőzések során a primer fertőzés alkalmával kialakult ellenanyagok, így a glikoprotein B specifikus ellenanyagok neutralizáló hatással bírnak. A CMV szeropozitivitás mértéke az adott ország szocioökonómiai helyzetével mutat összefüggést. A fejlett társadalmi viszonyok között, ahol a higiénés kultúra magasabb, az előfordulás gyakorisága alacsonyabb a fiatal felnőttek körében (50-60%), viszont az évek számával növekszik, és idős korra eléri a 90%-ot. A

fejldő országokban viszont az emberek többsége, 90%-a kétéves korra megfertőződik a vírussal. A szeropozitív egyénekben a vírus időnként reaktiválódva ürülhet a nyállal, az anyatejjel, a vizelettel, a vaginális és ondó váladékkal, és ilyen módon könnyen átvihető a szeronegatív egyénekbe. Emellett komoly problémát okoz, hogy vértanszfúzió vagy szerv transzplantáció alkalmával is átvihető. A primer fertőzés általában tünetmentes, viszont jelentkezhet tünetek kíséretében. A CMV felelős a mononucleosis infectiosa esetek kisebb százalékáért az *Epstein-Barr vírus* fertőzést követően. Nagyon súlyos problémát okozhat a CMV akár a primer vagy akár a reaktiválódó fertőzés formájában immunszupprimált egyénekben. A transzplantációt megelőző mesterséges immunszuppresszió hatására a gazdában látens formájában megújuló CMV is reaktiválódhat, de maga a donor szerv is tartalmazhat vírust, mely megfertőzheti a recipienst. Immungyenge egyénekben a CMV fertőzés leggyakrabban pneumonitist, hepatitist, colitist, oesophagitist, retinitist okoz. A CMV a leggyakoribb anyáról magzatra transzplacentálisan átvihető fertőzés, mely congenitalis károsodáshoz vezet. Azok az anyák adhatják át a vírust a magzatnak a legnagyobb valószínűséggel, akik a terhességük első trimeszterében fertőződnek primeren a vírussal. A CMV okozta leggyakoribb congenitalis elváltozások, betegségek: az alacsony súly, a microcephalia, kiütések, a hepatosplenomegalia, a sárgaság, az idegrendszerben fellépő fertőzések és ennek következtében a görcsök, melyek fatálisak lehetnek. A gyermekben későbbi élete során hallásproblémák, sükettség, látásproblémák, valamint tanulási nehézségek mutatkoznak. A hatékony védőoltás hiányában a terhesség előtt kialakult vírus specifikus immunválasz védő hatású. A szeropozitív anyákban keringő ellenanyagok átjutva a placentán megvédik a magzatot a súlyos zárványos CMV betegség kialakulásától. Egy hatékony, biztonságos, széles körben alkalmazható CMV vakcina kifejlesztése sürgető probléma világszerte, de főleg a fejlett országokban, ahol a szeropozitivitás alacsonyabb, így a congenitálisan károsodott magzatok aránya magasabb, valamint a fejlett egészségügyi rendszernek köszönhetően nagyobb számú immunszupprimált beteget gyógyítanak, és többen kerülnek transzplantációra, akik esetében egy akut vagy reaktiválódó CMV fertőzés letális is lehet. Egy potenciálisan látenciát előidéző vírus, mint a CMV gyengített formában nem valószínű, hogy engedélyt kaphat vakcinaként, így valamilyen aegységvakcinában kell gondolkodni. Annak kiderítése, hogy a vírus melyik proteinje, milyen immunválaszt vált ki, és a lakosság milyen mértékben válaszol ezen antigénekre, valamint hogy milyen formában immunizáljunk fontos elvárás, és ezen dolgozat egy fejezete az erre irányuló kutatómunka eredményeit tárgyalja.



## 2. A kísérletek során alkalmazott módszerek

### Sejtkultúrák fenntartása

Kísérleteink során használt sejtkultúrák: HeLa229, HEp-2, McCoy, J774A, A549, Vero, Caco-2, P815, MC57, MRC-5, egér fibroblaszt (egér embrióból általunk tripszinezéssel előállított), BM 12.4.

### A chlamydiák szaporítása, koncentrációja

*C. trachomatis* D (UW-3/CX), E (DK20), L2 (434/BU) serovar, *C. muridarum* (Nigg), *C. pneumoniae* (TWAR-183 és CWL-029) és a cardiovasculáris eredetű CV6 törzs szaporítása McCoy, HEp-2 vagy HeLa 229 sejtkultúráján történt. A fertőzött sejtkultúra szuszpenziót összegyűjtve, fagyasztottuk/olvasztottuk, majd a szuszpenziót lecentrifugáltuk (400g), a felülúszót ultracentrifugáltuk (30 000g). Annak üledékét SPG pufferben szuszpendáltuk. A kísérleteink során szükség volt álfertőzésre (mock) is, amit kontrollként használtunk. A mock preparátum előállítása ugyanúgy történt, mint a chlamydia inokuláció, csak a sejteket nem fertőztük chlamydiával.

### A chlamydia mennyiségi értékmérése

A chlamydia mennyiségének meghatározását indirekt immunfluoreszcens (IF) módszerrel végeztük. A baktérium szuszpenzióból tízes léptékű hígítási sort készítettünk, azzal fedőlemezen szaporított McCoy sejtkultúrát fertőztünk, majd 48 órás inkubáció után a sejteket a fedőlemezen acetonnal fixáltuk. Elsődleges ellenanyagként chlamydia MOMP vagy LPS, majd FITC-konjugált anti-egér IgG ellenanyagot használtunk. A törzs titerét inklúzió formáló egység (IFU)/ml-ben adtuk meg.

### Vírusok tenyésztése

A rekombináns canarypox vírusokat (ALVAC-pp65, -pp150, -IE-exon4, -gB, -pp28) csirke fibroblaszton, a vaccinia vírusokat (Vac-pp65, Vac-pp150, Vac-IE-exon4, Vac-gB, Vac-pp28) pedig Vero sejtkultúráján szaporítottuk és titráljuk plak módszerrel, a titert PFU/ml-ben adtuk meg.

### A *C. pneumoniae* antigén előállítása

A *C. pneumoniae* EB-eket HEp-2 sejtől tisztítottuk, ultracentrifugálással ülepítettük, majd formaldehiddel inaktívtuk. Az antigén fehérjetartalmát spektrofotométerrel határoztuk meg.

### Antimikrobiális vizsgálatok

*Chemokinek és növényi eredetű peptidok hatásának vizsgálata:* A MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10 és I-TAC/CXCL11, valamint különböző növényi eredetű peptidok anti-chlamydiás hatásának vizsgálatára a chlamydia EB-eket a chemokinek illetve növényi eredetű peptidok különböző koncentrációival inkubáltuk különböző ideig, majd azokat HeLa229, illetve HEp-2 sejten tenyésztettük.

*NAC és Ax kezelés hatásának vizsgálata:* a *C. pneumoniae* EB-eket a kísérletek egy részében előinkubáltuk az anyagok különböző koncentrációjával vagy a fertőzéssel egy időpontban mértük rá a McCoy vagy A549, sejtkultúrára. Néhány kísérletben a gazdasejtet kezeltük előzetesen NAC-cal, vagy azt a fertőzés után adtuk a rendszerhez. További 48 óra inkubálás után a sejteket fixáltuk és a visszatenyészthető *C. pneumoniae* mennyiségét IF módszerrel határoztuk meg.

*A HEC in vitro hatásának vizsgálata:* A *C. trachomatis* D és E szerotípusú EB-eket előinkubáltuk különböző HEC tartalmú vaginális szimuláns pufferben (pH 4.2 vagy 7.0). Az előinkubált chlamydia EB-eket HeLa229 a sejtekre mértük, 48 órás inkubálás után a chlamydia genomtartalmat qPCR-rel mértük, az inklúziók számát a hagyományos vagy automata ChlamyCount IF zárvány számlálással is detektáltuk.

*A flutikazon (FP) és a budeszolid (BUD) hatásának vizsgálata C. pneumoniae szaporodására:* Az A549 légúti epithel sejteket előkezeltük FP-vel vagy BUD-dal 24 óráig, majd a sejteket *C. pneumoniae*val fertőztük. A fertőzés után a sejteket 48 órán át inkubáltuk. Ezt követően a lemezeket gyors fagyasztottuk, az így a kapott sejtlizátumokat közvetlenül templátként használtuk fel a direkt qPCR vizsgálathoz, melynek segítségével a *C. pneumoniae* genom mennyiségére következtettünk.

### A MIG/CXCL9 in vitro termelődésének indukálása

J774A egér macrophág sejteket, valamint a laboratóriumunkban előállított egér fibroblaszt kultúrát *C. pneumoniae* CWL-029 vagy cardiovasculáris eredetű CV6 törzsekkel fertőztük, vagy hasonló mennyiségű hőinaktivált EB-vel kezeltük. A fertőzött sejtekhez különböző koncentrációban rekombináns IFN- $\gamma$ -t adtunk. A különböző módon fertőzött és kezelt sejtek felülúszójából mintát

vettünk 24, 48 illetve néhány kísérletben 72 óra múlva. A felülúszókat -80 C°-on tároltuk citokin és chemokín meghatározás céljára.

#### **HeLa229 és Caco-2 sejtek fertőzése**

A sejteket különböző cellal, különböző lemezekben tenyésztettük, majd *C. trachomatis*-szal fertőztük. különböző multiplicitással és körülmények között. A 6-lyukú lemezben fertőzött sejtekhez nem adtunk cycloheximidet a defensin (hBD-2) szekréció tesztelésére és az RNS expresszió elemzésének céljából. A chlamydia DNS mennyiségének meghatározásához 96-lyukú lemezekben fertőztük a sejteket cycloheximid tartalmú vagy cycloheximid mentes tápfolyadékban. A visszatenyésztethető chlamydia mennyiségét indirekt IF tesztben határoztuk meg.

#### **DC kultúra előállítás és fertőzése, citokin termelése**

Véradók véreből perifériás mononukleáris sejteket (PBMC) izoláltunk centrifugálással Ficoll-Paque PLUS sűrűség grádiens használva. A dendritikus sejteket (DC) adherens eljárást alkalmazva érleltük a vérben található monocytákból. A tenyésztés 7. napján a leváló éretlen DC-eket (iDC) összegyűjtöttük, majd centrifugáltuk és lemezbe helyeztük. Az iDC-k tisztasága kb. 90% volt, ezt áramlási citometriával, ellenanyagok keverékét használva igazoltuk. A DC-k IFN- $\gamma$  termelését kétféle módon is bizonyítottuk. A *C. pneumoniae* fertőzött DC-k felülúszójának IFN- $\gamma$  tartalmát ELISA módszerrel mértük, az intracellulárisan található IFN- $\gamma$  kimutatására áramlási citometriát alkalmaztunk. A fertőzött sejtek tápfolyadékához az IFN- $\gamma$  neutralizálására anti-humán IFN- $\gamma$  monoklonális ellenanyagot mértünk. A tápfolyadék TNF- $\alpha$  tartalmának neutralizálására anti-TNF- $\alpha$  ellenanyagot használtunk.

#### **MIG/CXCL9 illetve szintetizált peptidek kötődésének vizsgálata áramlási citometriával**

Annak kiderítésére, hogy a natív chlamydia EB-k képesek-e a MIG/CXCL9 illetve növényi peptidek kötődésére, chlamydia EB-t inkubáltunk MIG/CXCL9 vagy FITC jelölt antimikrobiális peptid jelenlétében két órán át. A MIG/CXCL9-cel kezelt EB-eket a mosást követően PE jelölt anti-MIG/CXCL9 poliklonális ellenanyaggal kezeltük. A festést követően a sejteket FACS StarPlus készülék segítségével analizáltuk.

#### **Az egerek fertőzése, kezelése, immunizálása**

Kísérleteink során 6-8 hetes nőstény BALB/c, illetve C57BL/6N egereket használtunk. A különböző kísérleteinkben az egerek száma változott. A reinfekciós kísérletünkben BALB/c egereket intranasálisan (*i.n.*) fertőztünk *C. pneumoniae*-val 1-3 alkalommal, 2 hónapos időközzel. A fertőzéseket követő különböző időpontokban az egereket feláldoztuk.

Az IL-17 citokinnek *in vivo* szerepének tisztázására BALB/c egereket *C. pneumoniae*-val *i.n.* oltottunk. Az egerek leölése különböző napon történt. Az egereknek másik csoportját *C. pneumoniae*-val illetve hasonló mennyiségű hőinaktivált *C. pneumoniae*-val oltottuk. A *C. pneumoniae*-val oltott csoportot kettéválasztottuk, az egerek felét további két alkalommal élő *C. pneumoniae*-val oltottuk 4 hetes időközzel, míg az egerek másik felét hőinaktivált *C. pneumoniae*-val kezeltük. Olyan kontroll csoportot is beállítottunk, mely első inokulálásra is hőinaktivált *C. pneumoniae* kezelésben részesült. Az egereket a kezelése után 2 és 4 héttel áldoztuk fel. Az IL-17 szerepének további vizsgálatára *i.n.* oltottunk *C. muridarum*-mal egereket, majd egy részüket a 28. napon újr fertőztük, az egereket a fertőzést követő különböző napokon áldoztuk fel.

A MIG/CXCL9 *in vivo* expressziójának tanulmányozására BALB/c egereket *i.n.* fertőztünk *C. pneumoniae*-val, az egerek leölése különböző napokon történt.

A *C. muridarum* plazmid gének kifejeződésének vizsgálatára C57BL/6N és BALB/c egereket inokuláltunk *C. muridarum*-mal *i.n.*, majd a fertőzést követő különböző napokon kerültek feláldozásra. Az egerek egy-egy elkülönített csoportját háromszor oltottuk *C. muridarum*-mal 4 hetes időközzel, majd minden oltást követően 2 héttel 10-10 egeret feláldoztunk mindkét vizsgált egér törzsből további vizsgálatokra.

A *C. pneumoniae* LcrE protein elleni immunválasz protektivitásának vizsgálatára BALB/c egereket immunizáltunk subcutan (*s.c.*) LcrE fehérjét és Alum vagy Freund adjuvánst tartalmazó keverékkel. Az első immunizálást 3 hetes időközönként egy 2. és 3. vakcinálás követte. Két héttel az utolsó immunizálást követően a kezelt és a nem kezelt egereket *i.n.* fertőztük *C. pneumoniae*-val. Az egereket a fertőzés utáni 7. napon öltük le. A pGP3 és pGP4 proteinek immunogén és protektív szerepének

tisztázására C57BL/6N egereket immunizáltunk s.c. a rekombináns proteinnel Alum adjuvánszal keverve 3 alkalommal. Két héttel az utolsó immunizálást követően az egerektől a retrobulbáris vénáskötegből vért vettünk a specifikus Ig-k tesztelésére, a *C. muridarum in vitro* neutralizálására, valamint későbbi passzív immunizálás céljából. A védelem kimutatására az egerek egy részét *C. muridarum*mal fertőztük, majd a fertőzést követően 7. napon az összes egeret leöltük. Annak igazolására, hogy a pGP3 illetve pGP4 immunizált egerek savói rendelkeznek-e protektív hatással, C57BL/6N egereket kezeltünk intraperitoneálisan (*i.p.*) immunizált állatokból származó szérummal a fertőzést megelőzően, valamint a fertőzést követően. Egy másik kísérletben a *C. muridarum* EB-ket *in vitro* kevertük össze pGP3 és pGP4 immunizált egerek savójával, majd ezzel *i.n.* fertőztük az egereket. A védelem tesztelése céljából ezen egereket is a kezelés utáni 7. napon áldoztuk fel.

A *C. pneumoniae* atherosclerosis indukáló aktivitásának vizsgálatára a kísérleteink során ApoB100only/LDL<sup>-/-</sup> és ApoE<sup>-/-</sup> egereket használtunk. A fertőzést követő 12 héten keresztül az egereket normál rágcsálótápon vagy magas zsír-/koleszterintartalmú étrenden tartottuk. Az egereket *i.n.* fertőztük háromszor, 2 hetes időközönként *C. pneumoniae*val. Egy héttel minden fertőzés után és a kísérlet végén vért nyertünk. A chlamydia RNS kimutatására az aorta szövetből további egerek csoportjait fertőztük meg, és 1 és 4 héttel az első fertőzés után, és 5 héttel a harmadik fertőzés után feláldoztuk őket.

A triptofán metabolizmus tanulmányozására az egereket *C. pneumoniae*val (BALB/c) vagy *C. muridarum*mal (BALB/c és C57BL/6) fertőztük. Az egereket a fertőzés után 7 nappal feláldoztuk.

AzIDO kifejeződésének gátlása céljából 7 nappal a *C. muridarum* fertőzés előtt a BALB/c egerek ivóvizét IDO-gátló, 1-metil-DL-triptofán tartalmú Stevia édesítőszeres vízre cseréltük. A kontroll egerek Steviával édesített ivóvizet kaptak. Az egereket a fertőzés 7. napján áldoztuk fel.

Az NAC és Ax hatásának vizsgálatára BALB/c egereket fertőztünk *i.n.* *C. pneumoniae*val és ezt követően ivóvízben elkevert NAC-cal vagy Ax-szel kezeltük az állatokat *per os* minden nap. Az egereket a 7. napon, egy másik kísérletben a 20. napon áldoztuk fel.

A HEC hatásának *in vivo* monitorozására BALB/c egereket s.c. kezeltünk medroxyprogesteron acetáttal, egy héttel a fertőzés előtt. Az egereket HEC-cel kevert *C. trachomatis* D szerovariánssal, a kontroll egereket HEC kezeletlen chlamydiával intravaginálisan oltottuk. A visszanyerhető chlamydiát a cervicovaginális mosást követően, 3 nappal a fertőzés után, IF módszerrel állapítottuk meg.

Az FT és a BUD hatásának vizsgálata céljából kísérleteink során BALB/c egereket vizsgáltunk. Az egerek BUD-ot, FP-t vagy PBS-t inhaláltak *C. pneumoniae* fertőzés előtt 3 napon (15 percig), majd a fertőzést követően további hét napig. A 10. napon az egereket feláldoztuk.

Az egerek DNS immunizálásához szükséges CMV (pVR-gB, pVR-gB $\Delta$ tm, pVR-pp65) és az IFN- $\alpha$ -t (pIFN- $\alpha$ ) kifejező plazmidokat *E. coli*ban szaporítottuk. Kísérleteink során BALB/c és CBA nőstény egereket használtunk. Az egerek egyik csoportjában a DNS vakcinát egy szúrással juttattuk be a quadriceps izomba, a másik csoportban viszont a quadriceps izmot 3 helyen inokuláltuk. A DNS immunizálási kísérleteink során különböző mennyiségű DNS-t alkalmaztunk, és az egerektől különböző időpontokban vért nyertünk az antigénre kialakult immunválasz tanulmányozására.

A különböző kísérleteink során az állatokat a fertőzés utáni eltérő napokon cardiális punkciót alkalmazva áldoztuk fel. A vért heparinos csőbe tettük. A szérumokat fagyasztva tároltuk különböző chlamydia vagy CMV specifikus Ig-k, valamint cytokinek kimutatása céljából. A tüdőt eltávolítottuk, majd steril homokkal homogenizáltuk. Az egyik részből teljes RNS kivonást végeztünk. A homogenizált tüdő másik részéhez tápfolyadékot adtunk a tüdő cytokin, Ig valamint a visszatenyészthető chlamydia

mennyiségi meghatározására. Némely kísérletünkben az állatok lépét az eltávolítást követően eldörzsöltük, majd mosást követően megszámloltuk a mononukleáris sejteket.

#### **A chlamydia infektív titerének meghatározása egér tüdőben**

A tüdőszuszpenziókat olvasztottuk, fagyasztottuk és ultrahangoztuk, majd tízes léptékű hígítási sort készítettünk belőlük. A hígításokat fedőlemezen tenyésztett sejtekre mértük, és a visszatenyészthető chlamydia mennyiségét indirekt IF módszerrel határoztuk meg.

#### **Cytokin, chemokin szintek mérése egerek tüdejéből és *in vitro* kísérletek mintáiból ELISA módszerrel**

A chlamydiával fertőzött egerek homogenizált tüdejét lecentrifugáltuk és a felülúszót használtuk a cytokin szintek meghatározására. A különböző kísérleteink során a következő ELISA kiteket használtuk: a *C. pneumoniae* reinfekciós kísérletünk során az IFN- $\gamma$  és IL-6 tartalmat OptEIA ELISA szettek segítségével mértük. Az IL-17 cytokin család valamint az FT és BUD hatásának vizsgálatára végzett kísérletünkben az egértüdők IL-17A, KC, LIX és MIP-2 tartalmának kimutatására Quantikine® egér chemokine/cytokine, az IL-4, IL-10, IL-12, IL-17E és IFN- $\gamma$  detektálására Ready-SET-Go! kiteket használtunk. A *C. pneumoniae*val fertőzött Caco-2 sejtek hBD-2 termelődés kimutatására a sejtek felülúszóit hBD-2 ELISA kittel vizsgáltuk.

#### **Az IL-17A *in vivo* neutralizálása egerekben anti-IL-17 ellenanyaggal**

A neutralizációs kísérlet során a BALB/c egereket 2 csoportra osztottuk, anti-IL-17 kezelt és kontroll csoportra. Az anti-IL-17 csoportba tartozó egereket a fertőzést megelőzően egy nappal, majd azt követően egy nappal patkány anti-IL-17 ellenanyaggal, míg a kontroll állatokat patkány izotípus IgG-vel *i.p.* kezeltük. Az állatokat a fertőzést követő 1. és 4. napon áldoztuk fel.

#### **Bronchoalveoláris lavage (BAL) sejt elemek vizsgálatára**

A feláldozást követően az egerek tüdejét 1 ml PBS-sel átöblítettük, az így nyert sejtuszpenziót tárgylemezre helyeztünk, majd centrifugáltuk. A fixálást követően May-Grünwald-Giemsa festést végeztünk és megszámloltuk a különböző fenotípusú sejt populációkat.

#### **Chlamydia fertőzött egértüdők hisztopatológiai analízise**

A *C. muridarum*mal fertőzött egereket a fertőzés 4. héten elaltattuk, a tüdejüket fagyasztófolyadékba (OCT) helyeztük, majd metszeteket készítettünk. A mintákat monoklonális anti-IL-17E ellenanyaggal majd FITC-konjugált anti-egér IgG ellenanyaggal kezeltük. A pGP3 és pGP4 fehérjével immunizált egerek tüdejét a fertőzést követő 14. napon, a perfundálást követően egyben eltávolítottuk és OCT-be helyeztük. A mintákból metszeteket készítettünk és H&E festettük. Az IDO1 és IDO2 immunhisztokémiai vizsgálatokat fertőzött BALB/c egerek tüdejéből végeztük. Az IDO immunhisztokémiai vizsgálata során kecske poliklonális anti-IDO1 és nyúl poliklonális anti-IDO2 ellenanyagokat alkalmaztunk első ellenanyagként, majd a detektálást HRP-vel konjugált kecske ellenes nyúl és anti-nyúl kecske szekunder ellenanyagokkal végeztük.

#### **Az egér szövetminták preparálása az atherosclerosis fokának mérése**

A *C. pneumoniae* fertőzés után az egereket feláldoztuk, a szívet és az aortát pufferolt formalinnal, a bal kamrán keresztül adagolva perfúzióval fixáltuk. A formalin perfúzió után a szív felső részét és a leszálló aortát kiboncoltuk. Egerek egy csoportjából az aorta sinus mintákat összegyűjtöttük RNS extrahálása céljából. A szív alapját elválasztottuk az aortától, amelyet a csípő elágazásig kibevarraltuk. A szív felső részét paraffinba ágyasztuk és morfometriai analízishez metszettük. Az atherosclerosis mértékének meghatározására az erek metszetéről képet készítettünk, amelyen a plakk területét a JMicroVision szoftver segítségével körberajzolva, kiszámoltuk a plakk által fedett lumen százalékát.

#### ***C. pneumoniae* specifikus ellenanyagok kimutatása a fertőzött egerek szérumából**

A *C. pneumoniae* reinfekciós és az atherosclerosis kialakulására irányuló kísérletünk egereinek plazmamintáit minden fertőzés után egy héttel begyűjtöttük és megvizsgáltuk a *C. pneumoniae* specifikus IgG, IgM és IgA szinteket az általunk kifejlesztett ELISA teszt segítségével.

#### **Az IL-17A termelő sejtek fenotípusának meghatározása ELISPOT módszerrel**

Annak kiderítésére, hogy milyen fenotípusú sejtek termelik az IL-17A-t a *C. pneumoniae* fertőzés során, a lépsejteket negatív szelekciónak vetettük alá. A lépsejtek azonos sejtszámú csoportjait anti-CD4, a másikat anti-CD8 specifikus monoklonális ellenanyaggal borított mikrogöngyökkel, a harmadikat mindkettővel [CD4 (L3T4) és CD8a (Ly-2)] kezeltük, és a sejteket mágneses sejtszeparáló rendszert használva negatívan szelektáltuk. A depléciónak eredményességét áramlási citometriai vizsgálattal ellenőriztük. Kísérleteink során IL-17A specifikus ELISpot kitet használtunk. A keletkezett foltok (spotok) számát három párhuzamos alapján sztereomikroszkóp segítségével határoztuk meg, és a középértéket extrapoláltuk 1 millió sejtre.

#### **A lépsejtek negatív szelekciója és adoptív transzferük**

Adoptív transzfer céljából a pGP3 vagy pGP4 proteinnel immunizált C57BL/6N egereket az immunizálást követően feláldoztuk, a lépüket eldörzsöltük, és a sejteket az előzőekhez hasonló módon mágneses szeparálásnak vetettük alá. A depléciónak sikerességét áramlási citometriás vizsgálattal ellenőriztük. Ezt követően naiv egereken a farokvénán keresztül adoptív transzfert végeztünk ( $1 \times 10^6$  CD4-re vagy CD8-ra depletált sejtet adtunk egerenként). Az adoptív transzfert követően az egereket 24 óra múlva fertőztük *C. muridarum*-mal, majd 7 nappal később feláldoztuk őket és tüdejükből visszatenyésztést végeztünk.

#### **Az *lcrE* valamint *C. pneumoniae* plazmid gének klónozása, a fehérjék túltermeltetése**

A *C. pneumoniae* CWL-029 törzsének DNS-ét használva templátként, az *lcrE* 1218-bp DNS szakaszát PCR segítségével amplifikáltuk, klónoztuk és expresszáltattuk. *C. muridarum* Nigg törzset használva templátként a 723 bp fragmenst tartalmazó TCA04 és a 309 bp fragmenst tartalmazó TCA05 szakaszokat PCR segítségével amplifikáltuk hasonló módon, mint az *lcrE* esetén. Az amplikont NdeI és EcoRI enzimekkel emésztettük és p6HisF-11(icl) pET vektorba inszertáltuk. A fehérje túltermeltetéshez az *E. coli* HB101 törzset használtuk.

#### **A rekombináns fehérjék (*LcrE*, pGP3, pGP4) tisztítása**

A lefagyasztott *E. coli* lizátumot az olvasztást követően reszuszpendáltuk lízis pufferben, proteáz inhibitor jelenlétében. A sejtek feltárását ultrahangozással segítettük. A rekombináns proteineket TALON CellThru Resin módszer segítségével tisztítottuk.

#### **A CMV gB proteinjének előállítása**

Vero sejteket fertőztünk a gB szekretált formáját kifejező vaccinia vírussal. A CMV gB proteint a felülúszóból tisztítottuk affinitás kromatográfiás módszerrel.

#### **Lymphocyta proliferációs teszt**

*C. muridarum*-mal fertőzött BALB/c és C57BL/6N egerek lépét eltávolítottuk, sejtuszpenziót készítettünk belőlük, ezt követően pGP3 vagy pGP4 rekombináns proteint vagy hőinaktivált *C. muridarum* EB-t illetve mock preparátumot adtunk a sejtekhez. Az antigénekre létrejött proliferációs választ MTT analízis segítségével detektáltuk. Az *LcrE* proteinnel immunizált egerekben kialakult *LcrE* specifikus celluláris válasz vizsgálata hasonlóan történt, ez esetben rekombináns *LcrE* proteinnel történt a stimulálás.

#### **Western blot**

A tisztított pGP3 és pGP4 proteineket valamint a *C. muridarum* EB-eket 4x Dual Color Protein Loading pufferben főztük, majd a proteint szeparáltunk SDS poliakrilamid gélelektroforézissel, majd átvittük

polyvinylidene difluoride membránra, a membránok telítését követően fertőzetlen vagy *C. muridarum* fertőzött BALB/c illetve C57BL/6N egerek savóival kezeltük. Egy másik kísérletünk során a pGP3 illetve pGP4 proteinek immunogén szerepének vizsgálatára pGP3 és pGP4 immunizált C57BL/6N egerek savóival kezeltük a membránokat. Ezek után (bármely Western blot eljárás esetében) a mosást követően a membránokat HRP-konjugált anti-egér IgG-vel kezeltük, majd a létrejött immunológiai kötődést diaminobenzidin-tetrahidrokloridot (DAB) és hidrogén-peroxidot tartalmazó pufferben detektáltuk.

#### **Far Western blot analízis**

A koncentrált *C. pneumoniae* EB-ket, valamint a mock készítményt hőkezeltük, majd SDS poliakrilamid gélelektroforézissel elválasztottuk, blotoltuk, majd a membránt rekombináns MIG/CXCL9 chemokin tartalmú pufferrel kezeltük. A mosást követően HRP-konjugált anti-MIG/CXCL9 ellenanyaggal inkubáltuk. Hasonló módon jártunk el a *C. trachomatis* növényi peptidekkel való kapcsolódásának kimutatása során. A kísérleteink során kialakult immunológiai kötést DAB-bal detektáltuk. Kísérleteink során két párhuzamossal dolgoztunk, és a szeparált fehérjéket tartalmazó gélt Comassie-Blue festékkel festettük, és a Far Western blot vizsgálat során kapott csíknak megfelelő molekulásúlyú proteint kivágtuk a gélből és tömegspektrometriás (LC-MSMS) vizsgálatra bocsátottuk.

#### **DNS immunizált egerek CMV specifikus ellenanyagválaszának kimutatása ELISA módszerrel**

Az egér szérumokból a gB-specifikus ellenanyag kimutatására immunaffinitással tisztított gB fehérjét használtunk. Az egér szérumokban jelenlevő specifikus ellenanyag jelenlétét HRP-konjugált kecske anti-egér IgG F(ab)<sub>2</sub> ellenanyaggal mutattuk ki.

#### **A DNS immunizált egerek CMV neutralizációs képességének vizsgálata mikroneutralizációval**

A szérumok felező léptékű hígításait inkubáltuk 4000 PFU/lyuk HCMV (Towne törzs) és tengerimalac komplement jelenlétében. Ezt követően hozzáadtuk a szuszpenzióban lévő MRC-5 sejteket. 48–72 óras inkubálás után a neutralizáló titert úgy határoztuk meg, mint a legmagasabb szérumhígítás reciproka, mely citopátiás hatást még nem mutatott.

#### **DNS immunizált egerek CMV antigén specifikus citotoxikus T-lymphocyta (CTL) aktivitásának mérése <sup>51</sup>Cr felszabadulási teszttel**

Az immunizált egerek lépsejtjeit *in vitro* 5 napig stimuláltuk rekombináns HCMV-pp65-t expresszáló vaccinia vírussal fertőzött (VacWR-pp65) autológ lépsejtekkel (effektor:stimulátor (E:T) arány=2:1). A nem kitapadó lépsejtek citolitikus aktivitását <sup>51</sup>Cr felszabadulási teszt segítségével mértük. Targetsejtként az MHC azonos P815, és a nem azonos MC57 sejt kultúrákat alkalmaztunk, amelyeket VacWR-pp65-tel vagy a parenterális VacWR vírussal fertőztük. A specifikus <sup>51</sup>Cr-felszabadulás százalékos arányát a következő módon számítottuk ki: [(cpm kísérleti felszabadulás - cpm spontán kibocsátás)/(cpm maximális leadás - cpm spontán kibocsátás) × 100]. Azokat az egereket tekintettük CTL pozitívnak, amelyeknél a specifikus <sup>51</sup>Cr felszabadulás >10% volt.

#### **Teljes RNS kivonás a fertőzött egerek tüdejéből, qPCR**

Cytokin, chemokin, plazmid gének vizsgálatára a fertőzött és kontroll egerek tüdejéből TRI reagens segítségével teljes RNS kivonást végeztünk. A kapott mintákat DNase1 kezelésnek vetettük alá. Az RNS mennyiségi meghatározása spektrofotometriás vizsgálattal történt, az RNS integritását agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük. A cDNS szintetizálására 2 µg teljes RNS-t, Superscript III enzimet és random hexamer primert alkalmaztunk. A qPCR-ek során a hígított cDNS-t használtuk specifikus primerek és SYBR® Green JumpStart™ Taq ReadyMix™ jelenlétében. Kísérleteink során vizsgált gének: *IL-17A, IL-17C, IL-17D, IL-17E, IL-17F, IL-23 p19, MIG/CXCL9, IP10/CXCL10, ITAC/CXCL11, IDO1-2, TDO, VDR, GR, β-aktin*, továbbá a *C. muridarum* plazmidján kifejeződő gének: *TCA01-07*. A primereket az

Integrated DNA Technologies Inc. szintetizálta. A legalacsonyabb ciklus számot, amelyben a különböző transzkriptumok detektálhatóvá váltak, fogadtuk el Ct-nek és ezt hasonlítottuk a  $\beta$ -aktinéhoz vagy a *C. muridarum* 16S rRNS éhez, a kettő közötti különbség adta a  $\Delta$ Ct értéket. A relatív expressziós szintet, mint  $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$  adtuk meg.

#### **C. pneumoniae DNS kimutatása többször fertőzött egerek szerveiből**

A *C. pneumoniae* reinfekció tanulmányozására a fertőzött és álfertőzött egerek tüdejéből, véréből és lépéből DNS-t vontunk ki Wizard Genomic DNA purification kittel. Az *ompA* gén kimutatása nested PCR analízissel történt, az *ompA* gént GeneAmp 2700 PCR System segítségével amplifikáltuk. A valós idejű PCR vizsgálatok LightCycler real-time PCR használatával történtek *C. pneumoniae groEL-1*-specifikus nested primerek alkalmazásával. Standard görbét a primerek segítségével amplifikált termék 10-es léptékű hígításával készítettünk. A kimutathatóság határa  $6.7 \times 10^2$  kópia/ml volt.

#### **A chlamydia DNS kvantitatív meghatározása HeLa229 és Caco-2 sejtekben**

A chlamydia szaporodás mennyiségi mérésére az általunk korábban leírt direkt kvantitatív PCR módszert alkalmaztuk. A 96- vagy 24-lyukas lemezekben tenyésztett sejteket chlamydiával fertőztük, és az inkubáció elteltével a fertőzött sejteket megmostuk. Ezután 100 vagy 625  $\mu$ l Milli-Q vizet adtunk a lyukakhoz és a lemezt  $-80^\circ\text{C}$ -on tároltuk. A DNS feltárására a sejtekből két fagyasztási-olvasztási ciklust alkalmaztunk. Az alaposan megkevert lizátumokat használtunk templátként a direkt qPCR során SsoFast EvaGreen® Supermix alkalmazásával. A chlamydia genomot *pyk* primer pár segítségével detektáltuk.

#### **RNS kivonás és qRT-PCR chlamydia fertőzött HeLa229 és Caco-2 sejtekből**

A génextpresszió detektálására 6-lyukas lemezekben tenyésztett fertőzött sejtekből különböző időpontokban teljes RNS-t vontunk ki GenElute Mammalian Total RNS Miniprep-pel. A cDNS-t qScript cDNA Supermix kit segítségével készítettük, majd azt templátként használva qRT-PCR végeztünk PerfeCTa SYBR Green Supermix-szel CFX96 Real Time C1000 Thermal Cycler készülékben *C. trachomatis euo*, *groEL*, *ftsK*, *omcB*, *ompA* és *pyk* specifikus primereket használva. Belső standardként a 16S rRNS-t használtuk a chlamydia gének relatív expressziójának meghatározására

#### **RNS kivonás és C. pneumoniae mennyiségi meghatározás valós idejű PCR-rel aorta mintákból**

A *C. pneumoniae* fertőzést követően az egerekből RNS extrahálására a megadott időpontokban összegyűjtöttük az aorta sinusokat, melyből teljes RNS kivonást végeztünk. A komplementer DNS-t DNáz-zal kezelt RNS-ből szintetizáltuk qScript cDNA Supermix szintézis kittel. A qRT-PCR-t a cDNS templát és PerfeCTa SYBR Green Supermix felhasználásával végeztük. A chlamydia 16S rRNS és eger  $\beta$ -aktin szekvenciákat amplifikáltuk. Az amplifikáció specifikitását olvadási görbe elemzéssel igazoltuk. A kópiaszámot a következő képlet segítségével számítottuk ki:  $\text{kópiaszám}/\mu\text{l} = [6.022 \times 10^{23} (\text{molekulák/mol}) \times \text{DNS koncentráció (g}/\mu\text{l})] / (\text{bázisok párok száma} \times 660 \text{ dalton})$ ; a standard görbét az amplikon tízszeres sorozatos hígításaiából készítettük (1000 000-ról 1 példányra). qPCR hígítási sorozat elemzése azt mutatta, hogy módszerünk érzékenységi küszöbértéke tíz 16S rRNS kópia volt.

#### **A C. pneumoniae DNS kimutatása humán arteria cerebri media szakaszokból**

Az artéria cerebri media atherosclerotikus mintáit 15 egymást követő boncolási alanyból, a halál beállta után 24 órán belül gyűjtöttük. Az egyes minták felét  $-70^\circ\text{C}$ -on tároltuk nPCR elemzéshez; a másik felét glutáraldehidben fixáltuk TEM vizsgálat céljából. Kontroll mintaként, 4 nem szklerotikus artéria cerebri media szolgált, melyeket balesetben elhunyt áldozatokból nyertünk. A DNS-t a fagyasztott mintákból extraháltuk High Pure PCR Template Preparation Kittel. A mintákat vakon teszteltük *C. pneumoniae* DNS kimutatására GeneAmp 2400 PCR alkalmazásával *C. pneumoniae ompA* génre specifikus primer segítségével. Az DNS intaktságát mindegyik mintában humán  $\beta$ -aktin génre specifikus primerek felhasználásával ellenőriztük. *C. pneumoniae*val fertőzött McCoy sejtekből kivont

DNS-t használtunk pozitív kontrollként. Az amplifikált DNS mintákat az ABI Prism DNS Sequencing Ready Detection Kit segítségével szekvenáltattuk.

#### **Az IDO1 és IDO2 RNS-Seq adatok validálása qPCR vizsgálattal**

A *C. muridarum* fertőzött egerek tüdejéből a kivont RNS-t reverz transzkripció során Maxima reverz transzkriptáz segítségével írtuk át, random hexamer primert alkalmazva. A qPCR vizsgálatokra Bio-Rad CFX96 készüléket használtunk. A qPCR-t SsoFast EvaGreen qPCR Supermix mastermix és az egér specifikus primer (*IDO1*, *IDO2*) párok használatával végeztük, Az amplifikáció specificitásának ellenőrzésére olvadásgörbe elemzést végeztünk. A Ct értékeket az *IDO1*, *IDO2* és *β-aktin* génekre kalkuláltuk és a normalizált gén expressziókat  $\Delta Ct$  módszerrel számoltuk.

#### ***C. muridarum* és *C. trachomatis* fertőzött epithel sejtek DNS chip és kvantitatív PCR analízise**

Egér epithel sejt kultúrát (BM12.4) fertőztünk *C. muridarum* vagy *C. trachomatis* L2 törzsekkel IFN- $\gamma$ -t tartalmazó tápfolyadékban. Kontrollként IFN- $\gamma$  mentes, de fertőzött sejt kultúrát, valamint mock fertőzést is alkalmaztunk. Az RNS-t a fertőzést követő 24 órát követően Trizol segítségével vontuk ki és RNeasy mini kittel tisztítottuk. A teljes RNS amplifikációja az Eberwine RNS amplifikációs protokollt követte, eukarióta target preparáló előírást használva. Az amplifikált biotin jelölt RNS-t hibridizáltattuk Affymetrix Mouse 430A teljes genom DNS chipre. Validálás során a korábban leírt qPCR körülményeket és primereket használtuk.

#### **Pathogén specifikus szerostátusz vizsgálata ELISA módszerrel**

Az akut ischaemiás stroke (AIS) és a *C. pneumoniae* szerostátusz közötti összefüggés vizsgálatára 59, egymás után érkező, stroke-os beteget válogattunk be az SZTE Neurológiai Klinikájának beteganyagából. A betegek átlagéletkora 52.8 év volt, és a következő kritériumoknak feleltek meg: 1) első nem cardiogén ischaemiás stroke; 2) a stroke kezelése az osztályon kellett, hogy megvalósuljon; 3) az osztályra felvételnek a stroke kezdete után 72 órán belül kellett megtörténni; 4) az életkor <65 év. Az AIS diagnózisa az újonnan kialakult fokális neurológiai jelek valamint vizsgálatok alapján történt. A kontroll csoportba 52 beteg került, akik ebben az időszakban nyertek felvételt az osztályra AIS nélkül. A vérmintát a tünet kezdete után egy héten belül gyűjtöttük. A szérumok specifikus ellenanyag tartalmát a következő ELISA kitekkel határoztuk meg: HSV-1 és 2 IgG (ETI-HSVK-G 1/2); HSV-1 IgA (EIAgene); CMV IgM és IgG (Enzygnost); EBV IgG (Captia EBV VCA (P18)); HHV-6 IgG (EIA); és *C. pneumoniae* IgM, IgG and IgA (NovaTec).

#### **A HCMV specifikus ellenanyag meghatározás**

A 34 egészséges véradó beválogatása részben a Wistar Intézetben (Philadelphia, PA), valamint az SZTE-n történt. A tanulmányba bevont egyének CMV szerostátuszát mikroneutralizációs teszttel, valamint az általunk kifejlesztett házi ELISA teszttel mértük.

#### **A véradó donorok perifériás sejtjeinek transzformálása Epstein-Barr vírussal**

A citotoxicitási teszthez szükséges target sejt kultúrák kialakítása céljából, a véradókból izolált lymphoid sejteket EBV-t tartalmazó B95.8 sejt felülúszójával kezeltük. A 2-3 hét alatt transzformálódott lymphoblastokat 15% FCS-t tartalmazó RPMI-ben tartottuk fenn, majd kellő számú sejtet nyerve lefagyasztottuk.

#### **A CTL aktivitás vizsgálata króm felszabadulási teszttel**

A véradók vérmintáiból a PBMC-eket Ficoll grádiensen történő centrifugálással nyertük. A tesztek során friss, illetve fagyasztott sejtekkel is dolgoztunk. A donorokból származó sejtek egy részét különböző CMV gént expresszáló canarypox rekombinánsokkal fertőztük, ezek a sejtek szolgáltak stimulátorként, a sejtek maradék része képviselte a „responder” sejt populációt. A sejteket ezt követően tenyésztőedénybe helyeztük 8-13 napra. A target sejtként használt különböző számú lymphoblastokat



vaccinia rekombinánsokkal (CMV géneket hordozó) fertőztük, 100  $\mu\text{Ci}$   $\text{Na}^{51}\text{CrO}_4$ -tal jelöltük. A jelölt sejteket 3 órával a mérés előtt megmostuk. Az effektor sejteket különböző arányban összekevertük a fertőzött target sejtekkel, majd 4 órás króm felszabadulási teszt alkalmazásával mértük a citotoxikus aktivitást. A tesztek során kontrollként nemcsak autológ HLA-1 azonos, hanem eltérő HLA típusú, heterológ targeteket is használtunk. A CTL-ek fenotípusának meghatározására a 8-13 napig inkubált effektor sejtek egy részét anti-CD4, a másik részét anti-CD8 ellenanyaggal, illetve a harmadik részét mindkét ellenanyaggal kezeltük tengerimalac komplement jelenlétében. A mosást követően 4 órás króm felszabadulási tesztben vizsgáltuk a különböző fenotípusú sejtek CTL aktivitását különböző targetsejteken.

#### **Memória CTL prekursor frekvenciájának meghatározása véghígítással módszerrel**

A frissen izolált, változó számú effektor PBMC-t egymást követő mélyedésbe mértük lemezbe és együtt inkubáltuk  $\gamma$ -besugárzott (3000 rad) autológ, EBV-vel transzformált Vac-pp65-tel vagy Vac-IE-exon4-gyel fertőzött lymphoblastokkal, autológ PBMC-eket használva „feeder” sejtekként. A 12–14 napos inkubációt követően a pp65 vagy IE1-exon4-specifikus CTL aktivitást minden lyukban úgy határoztuk meg, hogy a CTL-eket összekevertük Vac-pp65 vagy Vac-IE1-exon4 fertőzött autológ és eltérő HLA típusú célsejtekkel, majd a litikus aktivitást króm felszabadulási teszttel detektáltuk.

#### **Statisztikai módszerek**

A kapott adatok statisztikai elemzése a SigmaPlot for Windows Version 11.0 program segítségével Welch-próba vagy Wilcoxon-Mann-Whitney-próba alkalmazásával történt. Több, mint két csoport összehasonlítására variancia analízis (ANOVA) vizsgálat Tukey post-hoc teszttel történt.

### **3. Célkitűzések**

Kísérleteink során a következő 6 témakörben megfogalmazott kérdésekre kerestük a választ:

1. A különböző *Chlamydia* fajok által okozott infekciókat és reinfekciókat kísérő immunológiai változások a gazdaszervezetben
2. A chlamydia fertőzések szerepe krónikus betegségekben
3. Az IFN- $\gamma$  szerepe a chlamydia fertőzésekben
4. A chlamydiák okozta fertőzések megelőzésének lehetőségei
5. A chlamydiák okozta fertőzések terápiájának lehetőségei és a szaporodásukat befolyásoló tényezők
6. A CMV fertőzést kísérő celluláris és humorális immunválasz

## 4. Eredmények és megbeszélés

### 4.1. A különböző *Chlamydia* fajok által okozott infekciókat és reinfekciókat kísérő immunológiai változások a gazdaszervezetben

Ebben a témában az alábbi kérdésekre kerestük a választ

1. Indukálódnak-e az IL-17 cytokin családba tartozó cytokinek a *C. pneumoniae* fertőzés során?
2. Mi a szerepe az IL-17A-nak az akut *C. pneumoniae* fertőzés során?
3. Milyen fenotípusú PBMC-k felelősek az IL-17A termelődéséért a fertőzés során?
4. Hogyan változik az IL-17A és IL-17E expressziója a reinfekciók során?
5. Indukálja-e a *C. muridarum* az IL-17E expresszióját a primer és a szekunder fertőzést követően?
6. Milyen sejtek tehetőek felelőssé az IL-17E termelődéséért a *C. muridarum* fertőzés során?
7. Mennyi ideig, milyen kópiaszámban fordul elő a *C. pneumoniae* az ismételt fertőzések során a tüdőben és az egerek vérében?
8. Milyen típusú és szubtípusú immunglobulinok termelődnek és meddig mutathatók ki az ismételt fertőzéseket követően?
9. Hogyan alakul a chlamydia specifikus celluláris immunválasz reinfekciót követően?
10. Képes-e szaporodni a *C. trachomatis* béleredetű Caco-2 sejtekben?
11. Milyen mechanizmusok járhatnak ahhoz, hogy a *C. trachomatis* túlélhessen a gastrointestinalis traktusban?

#### **Az IL-17 szerepe a *C. pneumoniae* és *C. muridarum* fertőzések során**

Az IL-17A fontos szerepet játszik a mucosális és epitheliális védelemben a különböző patogének ellen, különösen a belekben és a bőr felszínén. Jelen kísérletünkben bizonyítottuk, hogy az egyszeri *C. pneumoniae* fertőzés indukálja az IL-17A és IL-17F expresszióját, viszont nem befolyásolja az IL-17C, IL-17D és IL-17E termelődését. Az IL-17A protektív szerepe a patogének elleni immunválaszban meglehetősen ellentmondásos. Kísérletünkben a CD4<sup>+</sup> lépsejtek depletálása drasztikusan csökkentette az IL-17A termelő sejtek számát ELISpot rendszerben vizsgálva, ami arra utalt, hogy főleg a CD4<sup>+</sup> sejtek felelősek az IL-17A termelésért *C. pneumoniae* fertőzést követően. Más sejtípusok, így az NK sejtek és a CD8<sup>+</sup> T-lymphocyták IL-17A termelését is leírták, de kísérletünkben a CD8<sup>+</sup> sejtek eltávolítása nem befolyásolta az IL-17A ELISpot módszerrel mért SFC (spot forming cell) számot. Irodalmi adatok alapján az IL-17A fokozza a neutrophil gyulladást a KC, LIX és MIP-2 termelésének indukálásával különböző sejtípusokban. Ennek megfelelően, ezen chemokinek jelenlétében fokozódik a neutrophil sejtek vándorlása a fertőzés helyére. Az anti-IL-17A monoklonális ellenanyaggal kezelt egereinkben lecsökkent a LIX, a KC és a MIP-2 szintje a fertőzést követő 1. és 4. napon. Ezen felül az IL-17A *in vivo* neutralizálása szignifikánsan csökkentette a neutrophil granulocyták számát a BAL folyadékban az izotípus kontroll ellenanyaggal kezelt egerekhez képest. Az IL-17A közömbösítésének további hatásaként megnőtt a visszatenyészthető baktériumok száma a korai fertőzés során, az élő chlamydia száma 3-szoros volt az izotípus kontroll ellenanyaggal kezelt egerekhez képest, ami arra utalt, hogy az anti-IL-17A kezelés következtében lecsökkent KC, MIP-2 és LIX szintek miatt csökkent a neutrophil sejtek beáramlása, ami kisebb mértékű baktérium eliminációhoz vezetett. Ezen eredményeink alapján azt mondhatjuk, hogy az IL-17A indirekt antimikrobiális hatást mutatott chlamydia ellen a fertőzés

korai szakaszában, ami arra hívja fel a figyelmet, hogy a különböző autoimmun eredetű kórképek kezelésében használatos monoklonális anti-IL-17 tartalmú szerek a fennálló chlamydia fertőzések súlyosbodását eredményezhetik. A primer *C. pneumoniae* fertőzés részleges rezisztenciát biztosít a reinfekciókkal szemben egér modellben, de nem védi meg az állatokat a súlyos, gyulladós szövődmenyeketől. A reinfekciós egér modellünkben kimutattuk, hogy az ismételt fertőzés emelte az IL-17E mRNS expressziót az egy alkalommal fertőzött egerekhez képest, különösen a fertőzés kései szakaszában, amikor az állatok külsőleg már a gyógyulás jeleit mutatták. Az IL-17A mRNS kifejeződése szintén emelkedett volt, akkor is, amikor élő *C. pneumoniae* már nem tudtunk kimutatni a tüdőben, ami arra utal, hogy az IL-17A-nak fontos szerepe van a krónikus gyulladós folyamatokban. Ezen megfigyelések nagyon érdekesek annak tükrében, hogy olyan légúti patogének, mint pl. a chlamydiák vagy a mycoplasmák által okozott reinfekcióknak szerepe lehet az asthmás tünetek aktiválásában. Az általunk elvégzett kísérletek alapján élő patogénre volt szükség az IL-17E mRNS kifejeződéséhez a fertőzés és az ismételt fertőzés során, ugyanis nem tapasztaltuk az IL-17E mRNS expresszió növekedését, ha az első és a második, illetve a harmadik kezelés is hőinaktivált *C. pneumoniae*val történt. Akkor sem emelkedett meg az IL-17E expresszió, ha először élő chlamydiával fertőztük az egereket, majd a későbbiek során inaktivált patogénnel kezeltük az egereket. Az IL-17A mRNS kifejeződése viszont fokozódott az élő chlamydiával történt fertőzést, valamint az inaktivált chlamydiával történt kezelést követően is, ami arra utal, hogy az IL-17A jelátvitel beindításához elegendő a baktériumon jelenlevő patogén asszociált mintázat, nem szükséges hozzá élő chlamydia. A *C. muridarum*mal végzett kísérleteink összhangban voltak a *C. pneumoniae* által kiváltott válasz vizsgálati eredményeivel. Az IL-17A termelő sejteknek fontos szerepük van a légúti mikroorganizmusok ellen kialakult immunválaszban. A szerepét az is alátámasztja, hogy a patogénnel történt ismételt fertőzés során a perifériás sejtek több IL-17A-t termeltek a lépben. A *C. pneumoniae* fertőzés eredményeivel egybevágóan azt találtuk, hogy az IL-17E génexpresszió és fehérjeszintézis a fertőzések utáni 4. héten indult meg, ami nagyon érdekes, mivel ebben az időpontban szinte ki sem lehet mutatni élő chlamydiát az egerek tüdejéből. Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy nem a perifériás sejtek a felelősek az IL-17E termelődéséért a megfertőzött egerekben, ami azt sugallta, hogy az IL-17E termelés kompartmentalizált, az IL-17E termelő sejteket a tüdőben találtuk meg. Ez utóbbi kísérletünk alapján elmondhatjuk, hogy eredményeink arra engednek következtetni, hogy a chlamydia reinfekciók kiválthatják az IL-17E termelődését, mely a Th2-es citokinek indukálásával az asthmás folyamatok kialakításában vehet részt. Így a chlamydia reinfekcióknak indirekt szerepe lehet az asthma tüneteinek kialakulásában.

#### ***A C. pneumoniae okozta reinfekciók jellegzetességei egér modellben***

A *C. pneumoniae* fertőzést utánzó állatmodellek, melyek ez idáig közlésre kerültek nem tartalmaznak egyértelmű, részletes információt a fertőzés és az ismételt fertőzések során kialakult ellenanyagok termelődésének kinetikájáról, a celluláris immunválaszról párhuzamosan az életképes patogén és a bakteriális DNS kimutatásával. Az általunk kidolgozott egér modellben a kéthónapos periódus a 3 inokuláció között biztosította, hogy az egerek klinikailag teljesen felépüljenek a betegségből; így az egér modellünk szimulálja az emberekben előforduló ismételt fertőzéseket. Irodalmi adatok alapján 4-6 évenként fordulnak elő járványok a humán populációban. Modellünkben az élő chlamydia gyorsabban kiürült az egerek tüdejéből az ismételt fertőzések során, mint az első inokulációt követően. Viszont a részleges védelem ugyanazon a szinten maradt a második ismételt fertőzést követően, tehát az immunválasz, amit az első ismételt inokuláció okozott, nem volt elég hatékony, hogy megvédje a

tüdőt a produktív fertőzéstől. Eredményeink szerint a *C. pneumoniae* DNS kiürülése a tüdőből sokkal kevésbé teljes, mint az élő baktériumé, ami a *C. pneumoniae* hosszú ideig tartó perzisztálásának a jele a fertőzést követően. Hosszú ideig tartó baktériumhordozás néhány egérben alakult ki. Az élő chlamydiánál nagyobb számú genom az egerek tüdejében utalhat nem fertőző chlamydia partikulák jelenlétére az inokulumban vagy a tüdőben való keletkezésükre a fertőzés során. A chlamydia fertőzés nem korlátozódik a légzőrendszerre. Modellünkben a PCR pozitivitás aránya, valamint a genom ekvivalensek száma gyorsabban csökkent a második és a harmadik fertőzés után, mint az elsőt követően. Azonban a *C. pneumoniae* DNS kimutatható volt intermittáló módon a vérben, későbbi időpontokban is. A kórokozó DNS-ének mennyiségéről a vérben primer és ismételt fertőzések követően elsőként számoltunk be. Az általunk kifejlesztett ELISA módszerrel az IgM ellenanyagot ki tudtuk mutatni, és vizsgálatunk azt sugallja, hogy az IgM jelenléte az éppen folyamatban levő fertőzés markere, függetlenül attól, hogy az primer vagy szekunder. Eredményeink szerint az ismételt fertőzések emelik az IgG2a/IgG1 arányt és elnyújtják a magas IgG2a szintet, ami a Th1-es típusú celluláris immunválaszra utal. Az Ig izotípus profil meghatározása a humán szérumban esetleg segíthet azonosítani azt, hogy a betegnek primer fertőzése vagy reinfekciója van-e. A kísérletünkben a primer fertőzés alacsony szintű IgA termelést váltott ki, viszont a reinfekciókat követően hosszú ideig tartó, magas titerű IgA ellenanyag szintet detektáltunk. A magas szintű IgA ellenanyag akkor is jelen volt az egerekben, ha nem hordoztak *C. pneumoniae* DNS-t a tüdejükben. Jó korrelációt találtunk a légzőrendszerben, valamint a vérben mért IgA szintek között. Kísérletünkben bizonyítottuk, hogy a primer fertőzést követően egy idő után bekövetkező csökkenés a celluláris immunválaszban visszaállítható a második, illetve a harmadik *C. pneumoniae* inokulációval, bár a reinfekció nem indukált szignifikánsan több IFN- $\gamma$  termelő sejtet, mint a primer fertőzés. Eredményeink fontosak lehetnek a *C. pneumoniae* okozta többszöri fertőzés és annak következtében kialakuló gyulladásos folyamatok tisztázásában.

#### **A *C. trachomatis* szaporodás vizsgálata bél eredetű Caco-2 sejtekben**

Kísérleteink során bizonyítottuk, hogy a *C. trachomatis* képes replikálódni a bél eredetű Caco-2 sejtekben, bár a szaporodási kinetikája eltért a HeLa229 sejtekben tapasztaltnál képest, ezt alátámasztotta, hogy kisebb genom és visszatenyészthető chlamydia mennyiséget mértünk a fertőzés után 48 órával, de a fertőzés után 72 órára ezek az értékek hasonlóak voltak a két sejttypusban. Bizonyos sejttypusok nem megfelelő „gazdák” a chlamydia számára (bennük a chlamydia nem tud a „klasszikus” módon szaporodni), ezekben a sejtekben a transzkripció mintázat a perzisztens formára emlékeztet. Mivel a chlamydia szaporodásának üteme a Caco-2 sejtben eltért az optimális gazdasejtben tapasztalttól, kíváncsiak voltunk arra, hogy a chlamydia melyik génjei fejeződnek ki eltérően a Caco-2 sejtben összehasonlítva azt a HeLa229 sejtben kapott génexpresszióval. A kiválasztott *C. trachomatis* gének expressziójának kinetikája a Caco-2 sejtekben a chlamydia elhúzódó replikációját mutatta a késői gének és a GroEL tartósan magas szintű expressziójával. Eredményeink arra utalnak, hogy a *C. trachomatis* replikációja a Caco-2 sejtekben bizonyos stresszválaszt vált ki a baktériumban. A Caco-2 sejt vonallal végzett kísérleteinkben a *C. trachomatis* fertőzés indukálta a hBD-2 kismértékű termelését. Kísérleteink alapján a vastagbél eredetű epitheliális Caco-2 sejt vonal kellően permisszív gazdasejt a *C. trachomatis* számára lehetővé téve a baktériumoknak a test ezen a helyén történő életben maradását. Az alacsony hBD-2 indukáló tulajdonságával együtt a *C. trachomatis* képes arra, hogy ott szaporodjon anélkül, hogy gyulladásos reakciót váltana ki. Ezek az eredmények alátámasztják azt az elméletet, miszerint a gastrointestinális traktus a nemi szervek extragenitális

túlélésének helyszíne lehet, és potenciálisan a genitális traktus újrafertőződésének forrása lehet, különösen a nőkben.

#### 4.2. A chlamydiák szerepe krónikus betegségekben

A kórokozók által okozott krónikus/perzisztáló fertőzések szerepét a krónikus betegségek (pl. atherosclerosis) kialakulásában igazolták. PhD értekezésemben vizsgáltam a *C. pneumoniae* és az atherosclerosis kapcsolatát *in vivo* egér modellben valamint különböző cardiovascularis betegségben szenvedők szérumában. Ezt a nyomvonalat folytatva összefüggéseket kerestünk a patogének és további cardiovascularis megbetegedések között. Kísérleteink során megvizsgáltuk továbbá azt is, hogy az ApoB100only/LDLR<sup>-/-</sup> egértörzs alkalmas-e a *C. pneumoniae* fertőzés atherosclerosis fokozó hatásának tanulmányozására.

*Ebben a témában az alábbi kérdésekre kerestük a választ*

1. Van-e összefüggés a *C. pneumoniae* szeropozitivitás és az ischaemiás stroke között?
2. Kimutatható-e a *C. pneumoniae* az arteria cerebri mediában?
3. Az ApoB100only/LDLR<sup>-/-</sup> egerek megfertőzhető-e *C. pneumoniae*val?
4. Megfigyelhető-e az atherosclerosis progressziója *C. pneumoniae* fertőzés következtében normál illetve atherogén diéta mellett az ApoB100only/LDLR<sup>-/-</sup> egerekben?
5. Kimutatható-e az életképes *C. pneumoniae* az ApoB100only/LDLR<sup>-/-</sup> egerek aortájában a fertőzést követően?

#### **A *C. pneumoniae* fertőzés és a cardiovascularis betegségek kapcsolata**

Korábbi munkánkban annak vizsgálatára, hogy különböző patogének által okozott fertőzések szerepet játszhatnak-e az akut myocardialis infarctus (AMI) kialakulásában, összehasonlítottuk a stabil effort anginás (SEA) és AMI-ban szenvedő betegek szérumának különféle kórokozókra specifikus IgG ellenanyag titereit a kontroll szérumokban mért szintekkel. Szignifikáns különbség mutatkozott az AMI betegek és a kontroll alanyok között a *C. pneumoniae* titer tekintetében korrigálás nélkül ( $P=0.012$ , OR=4.7), továbbá logisztikus regresszióval korrigálva a potenciálisan befolyásoló faktorokra nézve. Eredményeink azt sugallták, hogy a magas *C. pneumoniae* ellenanyag szint a perzisztens fertőzés aktiválódásának vagy egy folyamatos aktív fertőzésnek köszönhető az AMI betegekben. Ez a fajta összefüggés nem volt kimutatható az általunk vizsgált akut ischaemiás stroke (AIS)-on átesett betegekben. Nem találtunk szignifikáns különbséget a kísérletbe bevont AIS betegek szérumának *C. pneumoniae* specifikus ellenanyag szintje és a kontrollok között. Hasonlóan a *C. pneumoniae* esetében tapasztaltakhoz, nem különbözött a két csoport szérumában a HHV-6 és EBV specifikus IgG ellenanyag szint. További kísérletünkben az általunk végzett nPCR a vizsgált 15 elhunyt szklerotikus arteria cerebri media szakaszából 5-ben mutatta ki a *C. pneumoniae* jelenlétét, amit az elektronmikroszkópos vizsgálat és a további szekvenálás is megerősített. A *C. pneumoniae* jelenléte a középső agyi artéria atheroscleroticus plakkjaiban nem feltétlenül jelenti azt, hogy a *C. pneumoniae* a betegség oki tényezője; inkább felveti annak a lehetőségét, hogy a baktérium szerepet játszhat a betegség pathomechanizmusában.

#### **Az ApoB100only/LDLR<sup>-/-</sup> egér modell jelentősége a fertőzés hatásának vizsgálatában az atherosclerosis kialakulására**

Számos publikáció, amely a *C. pneumoniae* és az atherosclerosis kapcsolatát vizsgálta, az ApoE<sup>-/-</sup> modellt használta arra, hogy feltárja a kórokozó atherosclerosis indukáló képessége és/vagy a progressziója közötti kapcsolatot. Kísérleteink során azt vizsgáltuk, hogy a többszöri *C. pneumoniae*

fertőzés miképp befolyásolja az atherosclerotikus plakkok kialakulását ApoB100only/LDLR<sup>-/-</sup> egér törzsben, melyet a humán familiáris hiperkoleszterinémia legmegfelelőbb modelljeként tartanak számon. Az ApoB100only/LDLR<sup>-/-</sup> egér törzset úgy hozták létre genetikailag, hogy a plazma koleszterin nagy részét az LDL osztályba tartozó ApoB100 tegye ki, és atherosclerosis alakuljon ki bennük alacsony zsírtartalmú rágcsló diétán. Kísérleteink során először azt akartuk tisztázni, hogy az ApoB100only/LDLR<sup>-/-</sup> egerek szolgálhatnak-e modellként a *C. pneumoniae* atherosclerosis befolyásoló szerepének vizsgálatára. Ezért az egerek csoportjait normál vagy magas zsír-/koleszterintartalmú táplálékkal etettük, többször megfertőztük, hogy nyomon követhessük az atherosclerosis kialakulását *C. pneumoniae* újra fertőződéssel összefüggésben. A kísérleteink eredményei azt mutatják, hogy az ApoB100only/LDLR<sup>-/-</sup> egerekben, amelyeket normál étrenddel tápláltunk, a háromszori *C. pneumoniae* fertőzés fokozta az atherosclerosis kialakulását az aorta sinusban és a leszálló aorta falában. A magas zsír-/koleszterintartalmú étrend által indukált fokozott atherosclerosis a *C. pneumoniae* fertőzés nem súlyosbította tovább. Így minden további kísérletet a normál étrenden tartott egerekkel végeztünk. Azt feltételeztük, hogy az ApoB100only/LDLR<sup>-/-</sup> és az ApoE<sup>-/-</sup> egerek genetikai különbsége mellett maga a *C. pneumoniae* fertőzés és az általa indukált atherosclerosis jellegzetességei eltérhetnek, ezért összehasonlítottuk a baktérium fertőzés hatását a két egér törzsben. Infekciós modellünkben a sikeres fertőzést a *C. pneumoniae* specifikus IgG, IgA és IgM jelenléte mutatta. Kísérleteink alapján az IgG antitest szint tekintetében nem volt szignifikáns különbség az ApoB100only/LDLR<sup>-/-</sup> és ApoE<sup>-/-</sup> egerekben. A fertőzés másik jeleként az aorta mintákban az első fertőzés után 9 héten keresztül metabolikusan aktív *C. pneumoniae* tudunk kimutatni az ApoB100only/LDLR<sup>-/-</sup> egerekben. Eredményeink megerősítették a perzisztáló chlamydia jelenlétét, mivel a 16S rRNS gén kifejeződése arra utal, hogy a metabolikusan aktív baktérium is megtalálható a lézióban, nemcsak a fertőzések után megmaradó DNS vagy antigén. Ezek alapján elmondható, hogy az életképes chlamydia hosszú távú jelenléte egyes fertőzött egerek aortájában hozzájárulhat a fertőzés atherogén hatásához. Eredményeink alapján az ApoB100only/LDLR<sup>-/-</sup> egerek a jövőben jól hasznosíthatók a chlamydia és esetlegesen más patogének az atherosclerosis kialakulására és progressziójára gyakorolt hatásának vizsgálatára.

### 4.3. Az IFN- $\gamma$ szerepe a chlamydia fertőzésekben

*Ebben a témában az alábbi kérdésekre kerestük a választ:*

1. Miképp befolyásolja az IFN- $\gamma$  kezelés a *C. trachomatis* L2 és *C. muridarum* fertőzött petevezeték eredetű epithel sejtek génexpresszióját?
2. Indukálódnak-e potenciálisan antimikrobiális hatással bíró gének a chlamydia fertőzés során?
3. Indukálja-e a *C. pneumoniae* fertőzés az egerek tüdejében a MIG/CXCL9 és egyéb CXC chemokinek termelődését?
4. Van-e különbség a *C. pneumoniae* fertőzött és IFN- $\gamma$  kezelt különböző sejtek *in vitro* MIG/CXCL9 termelése között?
5. Rendelkezik-e anti-chlamydiás hatással a MIG/CXCL9, az IP-10/CXCL10 és az I-TAC/CXCL11?
6. A *C. pneumoniae* melyik felszíni proteinje felelős a MIG/CXCL9 kötődéséért?
7. Milyen potenciális anti-chlamydiás gének indukálódnak a *C. muridarum* fertőzött egerek tüdejében?

8. Hasonló-e a *C. muridarum* és a *C. pneumoniae* fertőzés által kiváltott antimikrobiális hatású fehérjék mintázata fertőzött egerek tüdejében?
9. Eltérő-e a *C. muridarum* fertőzésre kialakult antimikrobiális fehérjék termelődése különböző egértörzsekben?
10. Az emelkedett szinten kifejeződött antimikrobiális fehérjék *in vivo* neutralizációja befolyásolja-e az egerekből visszatenyészthető chlamydia mennyiségét?
11. Indukálja-e a *C. pneumoniae* fertőzés a dendritikus sejtek IFN- $\gamma$  termelődését és az befolyásolja-e a visszatenyészthető *C. pneumoniae* mennyiségét?

#### ***A chlamydia fertőzött és/vagy IFN- $\gamma$ kezelt egér epithel sejtek tanulmányozása DNS microarray módszerrel***

Munkánk során fontos megállapítás volt, hogy az IFN- $\gamma$  kezelésnek szignifikáns hatása van a chlamydia által indukált génexpresszió up- és downregulációjára. Azért, hogy megvizsgálhassuk a chlamydiák fajspecifitását a gazdasejti génexpresszióra, kétféle chlamydiát, egy humán és egy egér patogén fajt használtunk. A vártak megfelelően a kétféle chlamydia által indukált és represszált gének meglehetősen átfedőek voltak, viszont nem teljesen azonosak. Az egér chlamydia egymagában alkalmazva nagyobb számú gén expresszióját változtatta meg, mint a humán chlamydia, ha viszont a chlamydiákat IFN- $\gamma$  kezeléssel együtt alkalmaztuk, akkor a humán chlamydia kezelés eredményezett nagyobb számú gén expressziójában változást. Ezen különbség oka lehet mind a különböző korai kölcsönhatás a gazdasejttel, mind pedig a humán és az egér chlamydia életkörülményeinek megváltozása az IFN- $\gamma$  kezelés kapcsán. Ennek ellenére az alapvető megállapítás, miszerint az IFN- $\gamma$  a gazdasejti génexpresszió indukcióját vagy represszióját is fokozhatja, mindkét chlamydia esetében megfigyelhető volt. A kísérleteink során a csak chlamydia fertőzött, illetve chlamydia-fertőzött és IFN- $\gamma$  kezelt sejtek esetében a TLR2 szignál kaszkád különböző tagjainál láttunk upregulációt (TLR2, MyD88, I- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B által regulált gének). A TLR útvonal mellett az IFN- $\gamma$  receptor upregulációja mutatta az IFN- $\gamma$  receptor szignál útvonal — STAT1, STAT2, JAK2, IRF9 és SOCS1 — párhuzamos aktivációját a fertőzött és IFN- $\gamma$  kezelt mintákban. Számos IFN- $\gamma$ -indukált és IFN- $\gamma$ -val kapcsolatos gén upregulálódását tapasztaltuk még a csak fertőzött, de IFN- $\gamma$ -val nem kezelt sejtekben is, beleértve különböző p47 GTPázokat (OAS1G, IFIT1, STAT2, és IRF7).

Kísérletünk egyik fontos eredménye az emelkedett cytokin szekréció kimutatása a fertőzött és IFN- $\gamma$ -kezelt sejtekben. Ezek a cytokinek és/vagy chemokinek odavonzhatják és aktiválhatják a természetes és a tanult immunválasz különböző sejt típusait. A különböző T-sejt chemokinek, mint pl. a MIG/CXCL9, I-TAC/CXCL11, IP10/CXCL10, MIP3a, RANTES és a CXCL16 szignifikáns upregulációja további IFN- $\gamma$  termelő T-sejt infiltrációhoz vezethet, pozitív visszacsatolást okozva. A fertőzött és IFN- $\gamma$  aktivált epithel sejtek a lokális proinflammatorikus választ is fokozhatják. Kísérletünk során magas expressziót mértünk olyan cytokinek esetében, melyek a neutrophil sejtek, monocyták vonzásáért, aktiválásáért felelősek (MCP1, MCP3, GRO2, CXCL5, M-CSF, GM-CSF, IL-6 és a LIF). A chemokin-cytokin mediálta immunaktiváció mellett az IFN- $\gamma$  emelte az antigén feldolgozásban és prezentációban szerepet játszó fehérjék génkifejeződését mindkét chlamydia törzssel történt fertőzést követően. A kísérleteink során upregulálódott T-sejt chemokinek, a MIG/CXCL9, az I-TAC/CXCL11 és az IP10/CXCL10 hasonlóak az általános antimikrobiális peptidekhez, kis méretük, hidrofobicitásuk és normál pH melletti kationos töltésük tekintetében. Eredményeink alapján a MIG/CXCL9 potenciális antibakteriális aktivitással rendelkezett a chlamydiák extracelluláris formája ellen. Nagyon érdekes, hogy a *C. muridarum* kevésbé érzékeny az egér MIG/CXCL9-re, mint a humán chlamydia törzs. Mivel a MIG/CXCL9 csak akkor

mutatott antimikrobiális hatást, ha együtt inkubáltuk a chlamydia EB-ékkal, nem valószínű, hogy a kifejeződött MIG/CXCL9-nek hatása lenne a már fertőzött epitheliális sejtekre úgy, mint az IFN- $\gamma$ -nak. A MIG/CXCL9 inkább direkt akadályozhatja meg a chlamydiák terjedését lokálisan.

***A C. pneumoniae fertőzés indukálja a CXC chemokinek termelődését mRNS és fehérje szinten in vivo BALB/c egerekben***

A velünk született vagy más néven természetes immunválasz a legfontosabb módja a baktériumok hatékony eliminálásának a tüdőből. Az antimikrobiális peptidek, mint például a defenzinek a természetes peptid antibiotikumok közé sorolhatók. Amikor az ember találkozik egy mikroorganizmussal, ezek a peptidek adják a természetes immunválasz első védelmi vonalát, még mielőtt az adaptív immunválasz aktiválódása megtörténne. A defenzinek és bizonyos chemokinek pl. a MIG/CXCL9 hasonló paraméterekkel rendelkeznek. Az is közös a defenzinek és néhány chemokin esetén, hogy antimikrobiális hatással rendelkeznek. Kísérleteink során igazoltuk, hogy a *C. pneumoniae* fertőzés *in vitro* és *in vivo* is indukálja a MIG/CXCL9 expresszióját. A MIG/CXCL9 mRNS expressziós kinetikája követte a fertőzés során visszatenyészthető chlamydia EB-ék számának változását, vagyis a MIG/CXCL9 kifejeződés akkor volt a legmagasabb, amikor a legtöbb visszatenyészthető chlamydiát mértük az egér tüdő felülúszójában, a 7. napon. A 28. napon a MIG/CXCL9 mRNS kifejeződése még emelkedett szintet mutatott a kontroll egerekhez viszonyítva, viszont ekkor már fertőzőképes mikroorganizmust nem tudtunk visszatenyészteni. Elképzelhető, hogy a növekvő antimikrobiális hatás az oxigén independens baktericid mechanizmusoknak köszönhető, melybe beletartozik az IFN- $\gamma$  és az CXC típusú chemokinek hatása is. Várhatóan a chemokint szekretáló sejtek közvetlen mikro környezetében még magasabb chemokin koncentráció alakul ki, valamint a chemokin nemcsak egyedül lehet felelős az antimikrobiális hatásért, hanem hatása kombinálódhat, összeadódhat más chemokinek hatásaival. Munkánk során demonstráltuk továbbá, hogy a rekombináns MIG/CXCL9 dózisdependens módon gátolta a *C. pneumoniae* szaporodását. A kísérleteinkben az ELISA módszerrel mért MIG/CXCL9 koncentrációja alacsonyabb volt az egerek tüdő felülúszójában, mint az *in vitro* körülmények között hatásosnak bizonyult minimális baktericid koncentráció, de a természetes fertőzés során, a szervezetben *in vivo* viszonyok között lokálisan a tüdő érintett régiójában a chemokin koncentrációnak magasabbnak kell lennie. Már csak azért is magasabbnak kell lennie, mert a MIG/CXCL9 nagy affinitást mutat a heparinhoz. A glükózaminoglikánnal kialakult kapcsolat a MIG/CXCL9-et az epitheliális felszínen tarthatja, tovább emelve a lokális koncentrációját. Tömegspektrometriás (LC-MS/MS) vizsgálat segítségével azonosítottuk a chlamydia proteint, amely szerepet játszhat a MIG/CXCL9 megkötésében. A MIG/CXCL9 kötődött az OmcB proteinhez, melyet korábban a chlamydia külső membrán protein komplexének fő fehérjéjeként azonosítottak, amely meglehetősen konzervált molekula az összes chlamydiában. Az áramlási citometriai analízissel bizonyítottuk továbbá, hogy a MIG/CXCL9 nemcsak a denaturált proteinhez, hanem az élő EB-ékhez is képes kötődni.

***A C. muridarum indukálta antimikrobiális jelátviteli utak jellemzése egerekben***

Az intracelluláris chlamydia ellen a sejtek antimikrobiális jelátviteli utakat aktiválnak a kórokozó eliminálására. A humán sejtekben a *C. trachomatis* ellen főként azIDO aktiválódik, mely a triptofán lebontása következtében – chlamydia triptofánra auxotrof tulajdonsága miatt - a chlamydia éheztetésével, annak pusztulásához vezet. Korábbi munkák azt sugallták, hogy az egerekben, legalábbis egér sejt kultúrában *in vitro* körülmények között azIDO nem aktiválódik, helyette az antimikrobiális GTPázok játszanak szerepet a chlamydia elpusztításában. Kísérleteink célja volt az



egerekben működő, chlamydia ellenes védelmeket szolgáló gének megtalálása. Munkánk során az egereket *C. muridarum* és *C. pneumoniae* törzsekkel fertőztük. A *C. muridarum*mal fertőzött egér tüdő RNS szekvencia elemzése azt mutatta, hogy széles körben változott a gazdagének expressziója, és több upregulálódott gén szerepet játszhat a gazdaszervezetben a chlamydia-indukálta gyulladásban és a chlamydia ellenes védekezésben. Megállapítottuk, hogy mind a veleszületett, mind az adaptív immunitással kapcsolatos gének indukálódtak a *C. muridarum* fertőzött tüdőszövetben. A fő funkcionális „kategóriák” a citokin/chemokin expresszióval, a kemotaxisal, a szignál-transzdukcióval, az antigén bemutatásával, a sejtosztódással és a veleszületett antimikrobiális védekezéssel kapcsolatosak. Az IFN-indukálta GTPáz család számos tagját erősen indukálnak találtuk. Az RNS szekvenálás és a qPCR kimutatta, hogy az IDO1 és IDO2 gének is nagymértékben kifejeződnek a fertőzött tüdőben. Az IDO aktivitás forrásának megállapítására IDO1-2 immunhisztokémiai vizsgálatot (IHC) végeztünk a fertőzött és a kontroll tüdőszöveteken. Megállapítottuk, hogy a tüdő hörgő hámsejtjei mind a kontroll, mind a fertőzött szövetekben mérsékelt IDO1-2 pozitivitást mutatnak, ami alacsony szintű, nyugalmi állapotú expresszióra utal. Magasabb IDO1-2 pozitivitás volt kimutatható a leukocytákban, különösen a macrophágokban, mind a nem fertőzött, mind a fertőzött szövetekben, de a pozitív sejtek száma nagyobb volt a chlamydia fertőzött szövetekben. Génexpressziós adataink szerint a *C. muridarum* fertőzés által kiváltott egyik legfontosabb hálózat az IFN jelátviteli út, ennek megfelelően az IDO1-2 gén indukciója IFN hatására egyértelműen jelen volt a chlamydia fertőzött szövetekben. A triptofán bomlástermék, a kinurenin HPLC-vel történő vizsgálata a BALB/c egerek tüdejében azt mutatta, hogy a nem fertőzött egér tüdőszövetében az IDO aktivitás nem volt mérhető; bár a fertőzött hámsejtben és a macrophágokban kimutatható volt alacsony szintű IDO1-2 fehérje pozitivitás, ez nem eredményezett szignifikáns triptofán katabolizmust, valamint azt, hogy az IDO1-2 enzimek funkcionálisan aktívak, mind az egér, mind a humán chlamydiával fertőzött tüdőszövetekben. Az a tény, hogy a C57BL/6 egerek tüdöje is IDO aktivitást mutatott chlamydia fertőzés hatására, alátámasztja azt, hogy a megfigyelt IDO indukció nem egér törzs-specifikus válasz. Az egér IDO szerepét a chlamydia *in vivo* eliminálásában még korábban nem írták le. Az IDO1-2 aktivitás antimikrobiális szerepének tisztázása céljából a BALB/c egereket 1-methyl-tryptophan(1-MT)-nal (amely az IDO1 és az IDO2 korábban leírt inhibitora) kezeltük. Az IDO gátlása azt mutatta, hogy mérsékelt, de szignifikáns, megközelítőleg kétszeres mennyiségű chlamydia IFU tenyésztett vissza az 1-MT-nal kezelt egerekben, jelezve, hogy az IDO aktivitás befolyásolja a *C. muridarum* replikációját *in vivo*.

#### ***A C. pneumoniae* fertőzött dendritikus sejtek (DC-k) és az IFN- $\gamma$ kapcsolata**

Korábbi tanulmányokban beszámoltak arról, hogy az IFN- $\gamma$  tápfolyadékhoz adása korlátozza a fertőzőképes chlamydia utódok kialakulását macrophágokban, ami azt sugallja, hogy az IFN- $\gamma$  részt vesz a *C. pneumoniae* perzisztencia kialakításában ezekben a sejtekben. Munkánk során először azt vizsgáltuk, hogy az általunk érlelt, *C. pneumoniae* fertőzött DC-k termelnek-e IFN- $\gamma$ -t. Az eredmények szerint a fertőzött DC kultúrákban az IFN- $\gamma$  az 1.-től a 10. napig volt kimutatható, a maximális koncentrációt az 5. napon mértük. Kísérleteink során vizsgáltuk továbbá különböző faktorok – köztük az IFN- $\gamma$ , melyet a fertőzött DC-k termelhetnek – lehetséges gátló hatását olyan módon, hogy fertőzött DC-k neutralizáló hatású anti-IFN- $\gamma$  ellenanyaggal kezelt, vagy nem kezelt felülűszóját transzferáltuk *C. pneumoniae*val fertőzött HEp-2 sejt kultúrára. A *C. pneumoniae*val fertőzött, de IFN- $\gamma$ -val nem kezelt DC felülűszó csökkentette a *C. pneumoniae* hozamot HEp-2 sejteken, a gátlás 168-szoros volt a kontrollhoz képest. Azon hipotézis igazolására, hogy a fertőzött DC-k által termelt IFN- $\gamma$  gátolja a fertőző EB-k termelődését magában a DC-kben, a fertőzött DC-ket neutralizáló anti-IFN- $\gamma$ -val kezeltünk

és teszteltük a fertőzőképes EB-k mennyiségét HEp-2 sejteken történő visszatenyésztéssel. Az IFN- $\gamma$  neutralizációja megfelelő volt, mivel az IFN- $\gamma$  koncentrációja lecsökkent, összehasonlítva azt a nem kezelt kultúrák IFN- $\gamma$  koncentrációjával. Ennek ellenére az anti-IFN- $\gamma$ -kezelt vagy nem kezelt DC-kben termelődött fertőzőképes EB-k mennyiségében nem volt különbség visszatenyésztéssel. Ezek az eredmények rámutatnak arra, hogy elsősorban nem az IFN- $\gamma$  felelős a *C. pneumoniae* szaporodásának gátlásáért a DC-kben. Irodalmi adatok alapján a *C. pneumoniae* fertőzött DC-k TNF- $\alpha$ -t termelnek. Annak eldöntésére, hogy a TNF- $\alpha$  lenne felelős a DC-kben a *C. pneumoniae* szaporodásának gátlásáért, az IFN- $\gamma$  neutralizációs kísérlethez hasonlót végeztünk. Az eredmény hasonló volt, vagyis az anti-TNF- $\alpha$  sem önmagában, sem pedig anti-IFN- $\gamma$ -val kombinációban használva nem változtatta meg a DC-k EB termelését, ami arra utal, hogy a DC kultúrákban a *C. pneumoniae* perzisztens állapot kialakításában az IFN- $\gamma$ -tól és a TNF- $\alpha$ -tól független mechanizmusok játszhatnak szerepet. Összesítésként elmondható, hogy a *C. pneumoniae* fertőzött DC szubpopuláció IFN- $\gamma$  termelésre képes, ami hozzájárulhat *C. pneumoniae* elleni immunválasz formálásához és a *C. pneumoniae*hez társított krónikus betegségek immunpatológiájához, viszont nem befolyásolja a kórokozó szaporodását a DC-kben.

#### 4.4. A chlamydiák okozta fertőzések megelőzésének lehetőségei

Ebben a témában az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

1. Kivált-e a *C. pneumoniae* általunk előállított rekombináns LcrE hármas típusú szekréciós rendszer proteinje immunválaszt egerekben különböző adjuvánsokkal bejuttatva?
2. Van-e protektív szerepe az LcrE vakcinának?
3. Összemérhető-e az általunk LcrE proteinnel történt immunizálás során használt Alum adjuváns a Freund adjuváns hatásával?
4. Különböző genetikai hátterű egerekben kialakul-e humorális immunválasz chlamydiával többször fertőzött állatokban a chlamydia plazmid proteinek, a pGP3 és a pGP4 ellen?
5. Azonos formában ismerik-e fel a különböző fenotípusú egerek a plazmid fehérjéket?
6. A chlamydia fertőzés stimulálja-e a pGP3 és pGP4 specifikus T-sejtek képződését?
7. A pGP3 és pGP4 proteinnel történt immunizálás indukálja-e a specifikus ellenanyagok termelődését az egerekben?
8. Képes-e csökkenteni a pathológiás kép súlyosságát és a gyulladást okozó cytokinok mennyiségét a pGP3 és a pGP4 vakcina?
9. Protektív-e vagyis képes-e csökkenteni a pGP3 és pGP4 vakcina a visszatenyésztethető *C. muridarum* mennyiségét?
10. A vakcinálás hatására létrejött protekcióért az egerekben a kialakult celluláris vagy humorális immunválasz-e a felelős?

#### **A *C. pneumoniae* LcrE proteinjének immunogenitása egérmodellben**

Mivel a *C. pneumoniae* fertőzést sokszor nem diagnosztizálják, az alkalmazott antibiotikumok nem képesek teljesen gátolni a chlamydia szaporodását, valamint a természetes fertőzés által kialakított védelem sem komplett, fontos lenne egy hatékony vakcina kifejlesztése. A chlamydia genomika és proteomika legújabb előrelépéseinek köszönhetően, a legújabb vakcinák kifejlesztése került előtérbe. Az egyik potenciális aleggység vakcina jelölt az LcrE protein, amely egy szekretált effektor és negatív regulátor a *C. pneumoniae* TTSS rendszerének. Az aleggység vakcinák természetüknél fogva viszonylag kevésbé immunogének, ezért hatékony adjuváns szükséges használatuk során. Jelen munkánkban az

általunk előállított rekombináns LcrE protein által indukált immunitás protektív képességét és típusát vizsgáltuk. Az LcrE fehérjét Alummal formuláltuk, mivel ez az emberi vakcinák régóta biztonságosan alkalmazott adjuvánsa, és hatását összehasonlítottuk a Freund adjuvánszal bejuttatott LcrE immunogenitásával, protektivitásával. Választásunk a Freund adjuvánsra mint egyfajta pozitív kontrollra azért esett, mert az állatkísérletekben ez az adjuváns a „gold standard”, kitűnik ellenanyag és T-sejt választ, különösen Th1-es választ indukáló hatásával. Mindkét immunizálási protokollunk szerint szignifikánsan csökkent a visszatenyészthető *C. pneumoniae* száma a fertőzést követően az egerek tüdő felülúszójában. Az LcrE proteinünk mindkét adjuvánszal beadva magas, specifikus IgG szintet idézett elő az egerekben. Mivel az antitest izotípus profil, azaz a magas IgG2a/IgG1 arány szorosan korrelál a Th1-es típusú sejt mediálta válasszal, meghatároztuk az LcrE specifikus IgG2a és IgG1 antitestek szintjét a szérum mintákban. A Freund, illetve az Alum immunizálást követően is a Th2-es immunválaszra jellemző magas IgG1 ellenanyag szintet mértünk, az IgG2a ellenanyag szint fokozottabb emelkedését figyeltük meg a Freund immunizálás kapcsán az Alum immunizálással összehasonlítva, ami arra utal, hogy Th1-es immunválasz erősebb az LcrE+Freund immunizált állatokban. Az IFN- $\gamma$  szekretáló sejtek meghatározását a vakcináció protektív hatásának markerének tekintik. A sejt mediálta immunitás kimutatása lymphocyt proliferációs teszt segítségével és az IFN- $\gamma$  termelő sejtek totális számának meghatározása is azt sugallta, hogy mindkét immunizálási mód képes kiváltani hasonló szintű T-sejt közvetítette választ. Összefoglalva azt mondhatjuk, hogy az LcrE immunizáció Alum adjuvánszal kombinálva hasonló védelmet nyújtott *C. pneumoniae* fertőzés ellen, mint a Freund adjuvánszal adott protein, annak ellenére, hogy különbség mutatkozott az indukált IgG izotípus között, viszont az IFN- $\gamma$ -t szekretáló sejtek tekintetében nem volt különbség. A protektív hatás jól érzékelhető volt, mivel szignifikánsan csökkent a visszatenyészthető chlamydia mennyisége a tüdőben. Ezek alapján az LcrE fehérje egy potenciális komponense lehet egy későbbiekben kifejlesztett multi-subunit vakcinának. A különböző *C. pneumoniae* antigének formulálása Alum adjuvánszal segíthet azonosítani a protektív jelölteket és megtervezni egy multi-subunit vakcinát, mely képes az optimális védelem indukálására a *C. pneumoniae* fertőzés ellen.

#### **A *C. trachomatis* plazmid proteinjeinek (pGP3 és pGP4) immunogenitása egér modellben**

A *C. trachomatis* szerovariáns A, B, D, L1 és L2, valamint a *C. muridarum* Nigg törzsének a plazmidját már korábban szekvenálták. A szekvencia azonosság a plazmidokban aminosav szinten nagyobb, mint 96%, a különböző *C. trachomatis* szerovariánsok és a *C. muridarum* között pedig 82%. Ezen kriptikus plazmidot mint a *C. trachomatis* virulencia faktorát tartják számon, mivel a ritkán talált, plazmidmentes *C. trachomatis* formák kevésbé invazívák és kevésbé súlyos pathológiás elváltozást okoznak az egerek felső genitális szöveteiben. Kísérleti eredményeink megerősítették azt a korábban leírt tény, hogy a BALB/c egerek érzékenyebbek a chlamydia fertőzésre, mint a C57BL/6N egerek. Viszont meglepő eredményekre jutottunk a plazmid gének expressziós kinetikájának vizsgálata során a két egértörzsben. A C57BL/6N egerekben a plazmid gén expresszió a fertőzés korai szakaszában nem nagyon emelkedett, viszont a 14. napon sokkal kifejezettebb volt, mint a BALB/c egerek esetében. A BALB/c egerekben a plazmid gének expressziója inkább követte a fertőzés intenzitását, a visszatenyészthető chlamydia mennyiségi változásait. További érdekes eredmény volt, hogy a TCA04 és TCA05 gének – melyek a pGP3 és pGP4 fehérjéket kódolják – kifejeződése 3-szorosára emelkedett a BALB/c egerekben a fertőzést követő 7. és 14. napon. A *C. trachomatis* plazmidjának a fő antigénjét (mely a *C. trachomatis* fertőzés során szekretálódik), a pGP3-at a pORF5 kódolja. A pORF6 által kódolt 101-102 aminosav hosszúságú pGP4 protein funkciója még nem ismert. A különböző haplotípussal

rendelkező egerek, különböző módon válaszolnak a légúti chlamydia fertőzésekre. A Western blot kísérletünk alapján a *C. muridarum* fertőzött C57BL/6N egerek széruma a pGP3 plazmid fehérje monomer (28 kDa) formájával mutatott reaktivitást. Emellett a *C. muridarum* háromszor fertőzött egerek széruma kötődött a pGP4 proteinhez is a teszt során. Ezzel ellentétben a több alkalommal *C. muridarum* fertőzött BALB/c egerek széruma nem reagált a pGP3 monomer formájával, viszont erősen kapcsolódott egy magasabb molekulású fehérjéhez (80-85 kDa). Mivel a pGP3 plazmid proteinről már korábban leírták, hogy trimer formában is létezik és ennek molekulásúlya megegyezett a BALB/c egerek széruma által kötött fehérje méretével, azt valószínűsítettük, hogy ez a pGP3 protein trimer formája. Az LC-MSMS analízis megerősítette hipotézisünket, vagyis a fertőzött BALB/c egerek széruma a pGP3 fehérje trimer formájával reagált. A C57BL/6N egerekben a pGP4 specifikus ellenanyagválasz csak a harmadik fertőzést követően fejlődött ki. Ráadásul nemcsak a kevert egér szérumok reagáltak a pGP4 proteinnel a Western blot tesztben, hanem az individuális egerek széruma is. Eredményeink szerint a gazda genetikai háttere meghatározza, hogy a pGP3 monomer vagy trimer formáját ismeri-e fel. Emellett először számoltunk be arról is, hogy a fertőzött C57BL/6N egerek *in vitro* pGP3 és pGP4 stimulált lépsejtjei szignifikáns proliferációt mutattak. A celluláris reaktivitás a BALB/c egerekben hasonlóan bizonyult a humorális immunválaszhoz, miszerint a BALB/c egerek nem mutattak proliferációt a pGP4 fehérjére, viszont felismerték a pGP3 fehérjét 72 órás, *in vitro* restimulációs tesztben.

A pGP3 immunológiai szerepe ismert, viszont a pGP4 plazmid fehérje tekintetében meglehetősen kevés információ áll a rendelkezésre. A pGP4 protein esetleges protektív szerepének tisztázására terveztük meg kísérletünket, melynek során C57BL/6N egereket oltottunk rekombináns pGP3 vagy pGP4 proteinnel Alum adjuvánssal keverve. A választásunk azért esett erre az adjuvánusra, mivel az Alum hasonló védelmet indukált, mint a Freund adjuváns korábbi kísérletünkben. Western blot vizsgálattal igazoltuk, hogy a pGP3 és pGP4 proteinnel többszörösen immunizált egerek széruma tartalmaz plazmid protein specifikus ellenanyagokat. A rekombináns plazmid proteinnel történt immunizálás protektív immunválaszt alakított ki az egerekben. A pGP4 proteinnel történt immunizálás hasonló mértékben csökkentette a visszatenyészhető chlamydia mennyiségét, mint a pGP3 protein. A pGP4 fehérje protektív hatása meglepő, de nagyon érdekes, mivel a pGP4 nem szekretálódó, nem strukturális fehérje, egy nemrégiben megjelent tanulmány szerint chlamydia gének expressziójának transzkripció regulátora. Kísérletünkben az immunizált egerek tüdejében a gyulladás nagysága is csökkent, amelyet jól jelzett a csökkent IFN- $\gamma$  mennyisége a tüdőszuszpenzió felülúszóban. Hogy kiderítsük, az immunrendszer melyik ága felelős a pGP3 és pGP4 specifikus protektív válaszáért, *in vivo* és *in vitro* neutralizációs kísérletet terveztünk. Sem a pGP3, sem pedig a pGP4 protein nem indukálta neutralizáló ellenanyagok termelését, a visszatenyészhető *C. muridarum* száma nem változott az az immunsavóval kezelt egerekben a kontrollhoz képest. A plazmid protein specifikus ellenanyagoknak más szerepe lehet a fertőzés során, pl. segíthetnek a celluláris immunválaszban, növelve az antigén felvételt és a prezentációt. Az adoptív transzfer kísérletünkkel bizonyítottuk, hogy a pGP3 és a pGP4 plazmid proteinek védő hatásáért a CD4<sup>+</sup> sejtek felelősek. A pGP3 és pGP4 specifikus CD4<sup>+</sup> sejtek átvitele szignifikánsan csökkentette a visszatenyészhető chlamydia EB-ék számát miután az egereket *C. muridarum* fertőzésnek tettük ki. A kísérletünkben azt tapasztaltuk, hogy a CD8<sup>+</sup> sejtek transzfere az immunizált egerekből naiv egerekbe nem csökkentette jelentősen a tüdőből visszatenyészhető chlamydia mennyiségét. Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy a több alkalommal végzett pGP3 immunizálás szignifikánsan csökkentette a chlamydia mennyiségét a tüdőben a fertőzést követően. A pGP4 regulátoros proteinnel történt immunizálás hasonló protekciót alakított ki, mint a pGP3 protein.

A kialakult védelemért nem a pGP3 és pGP4 specifikus ellenanyagok, hanem a CD4<sup>+</sup> sejtek tehetők felelőssé *C. muridarum* fertőzés során. Munkánk eredménye fontos információkkal szolgálhat egy esetleges chlamydia elleni vakcina tervezése során.

#### 4.5. A chlamydiák okozta fertőzések terápiájának lehetőségei és a szaporodásukat befolyásoló tényezők

Ebben a témában az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

1. Rendelkeznek-e anti-chlamydiás hatással az NCR peptidek?
2. Befolyásolja-e a *C. pneumoniae* szaporodását a NAC *in vitro*?
3. Milyen hatással van a NAC a *C. pneumoniae* szaporodására egerekben?
4. Befolyásolja-e a *C. pneumoniae* szaporodását az Ax?
5. Van-e különbség az inhalációs szteroidok (FP és BUD) *C. pneumoniae* fertőzés kialakulására gyakorolt hatásában?
6. Milyen módon hat a HEC a *C. trachomatis* szerotípusok szaporodására *in vitro*?
7. Befolyásolja-e a HEC a *C. trachomatis* szaporodását a fertőzött egerekben?

##### **Az NCR peptidek anti-chlamydiás hatásának vizsgálata**

A *C. trachomatis* a szexuálisan átvihető bakteriális megbetegedések legfontosabb kórokozója a fejlődő és a fejlett országokban egyaránt. Új antimikrobiális szerek kifejlesztése elengedhetetlen addig is, míg nem áll rendelkezésünkre hatékony vakcina, hogy a súlyos szövődmények, mint pl. a méhen kívüli terhesség és az infertilitás elkerülhetők legyenek. Az antimikrobiális peptidek (AMP-k) potenciálisan ígéretes jelöltek lehetnek erre a célra, anti-chlamydiás szerepüket korábban még nem vizsgálták. A *Medicago truncatula* által termelt, majd szintetikus úton előállított több NCR (nodule-specific cysteine-rich) peptidről bizonyítást nyert, hogy hatékonyan pusztítják el a különböző Gram-negatív és Gram-pozitív baktériumokat. Kísérleteinkben megvizsgáltuk 11 NCR peptid *in vitro* anti-chlamydiás hatását. Ezek közül 7 mutatott szignifikáns antimikrobiális hatást a *C. trachomatis* ellen. Az LC-MSMS tömegspektrometriás vizsgálat alapján a chlamydia EB-éken az NCR247 peptid kötődéséért felelős fehérje a GroEL protein. Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy bizonyos NCR peptidek tekintélyes *in vitro* aktivitást mutatnak a *C. trachomatis* ellen. A jövőben egér modell beállítása szükséges annak vizsgálatára, hogy az *in vitro* kimutatott antimikrobiális hatás mennyire paralel az *in vivo* megfigyelésekkel. Pozitív esetben a jövőben az AMP-k hasznosak lehetnek mint anti-chlamydiás szerek.

##### **Az NAC hatása a *C. pneumoniae* *in vitro* szaporodására**

Az N-acetyl-cysteine (NAC) egy igen széles körben, leginkább mukolitikumként használt gyógyszer, mely vény nélkül beszerezhető. Kísérletünkben a NAC esetleges *in vitro* antimikrobiális hatását tanulmányoztuk *C. pneumoniae* ellen. Korábban kimutatták, hogy fokozza a szervezet fő antioxidánsának a glutationnak (GSH-nak) a mennyiségét emelve a glutathion-S-transzferáz aktivitást. A NAC direkt antimikrobiális hatást mutatott különböző extracelluláris baktériumokkal szemben. Ezzel ellentétben csoportunk azt találta, hogy a NAC ahelyett, hogy csökkentette volna, fokozta a *C. pneumoniae* szaporodását *in vitro* és *in vivo* egyaránt. *In vitro* vizsgálatainkban kimutattuk, hogy a NAC fokozta a patogén kapcsolódását a gazdasejthez, valószínűleg az OmcB redukálásával, és ez nem függhetett össze az emelkedett GSH szinttel, mivel a NAC-ot eltávolítottuk a rendszerből a kísérleteinkben alkalmazott mosási lépések során. A NAC negatív, a *C. pneumoniae* replikációt fokozó

képességén túl számolnunk kell esetlegesen más *Chlamydia* genusba tartozó species, pl. a *C. trachomatis* szaporodására gyakorolt hatásával is. A *C. trachomatis* az egyik, a szexuális élet során leggyakrabban átvihető kórokozó, és az esetek többségében, 70-90%-ban, az általa okozott fertőzés tünetmentes. Ez azt vonja maga után, hogy az infekció általában nem ismerik fel. A krónikus fertőzés legsúlyosabb szövődménye a méhen kívüli terhesség, a krónikus kismedencei gyulladás. A legrosszabb esetben a felsőlégúti fertőzés kezelésére rendelt és szedett NAC fokozhatja nemcsak a *C. pneumoniae*, hanem a fel nem ismert *C. trachomatis* szaporodását is. A *C. pneumoniae* egy meglehetősen gyakori légúti patogén, de sajnos ritkán diagnosztizálják megfelelő módon. Így, ha az orvos NAC-ot rendel nyákdoldóként (korrekt diagnózis hiányában) a beteg számára, késleltetheti páciense felépülését. Annak érdekében, hogy elkerüljük az NAC *C. pneumoniae*ra gyakorolt replikációt fokozó hatását, egy másik mukolitikumot, az Ambroxolt (Ax-t) vettük górcső alá. Az Ax szignifikáns anti-chlamydiás hatást mutatott *in vitro*, viszont nem befolyásolta a baktériumok sejthez való kötődését. Az Ax antimikrobiális hatásának komplett mechanizmusát nem vizsgáltuk, de az Ax fokozta az IDO2 expresszióját, mely dokumentáltan anti-chlamydiás hatása miatt, ha részlegesen is, de hozzájárulhatott a *C. pneumoniae* számának a csökkenéséhez. Az *in vivo* egérkísérletünkben a humán dózisnak megfelelő Ax nem befolyásolta a visszatenyészthető *C. pneumoniae* számát. Összefoglalásként azt mondhatjuk, hogy az NAC fokozza és elnyújtja a *C. pneumoniae* fertőzést az egerekben. Klinikai vizsgálatok szükségesek az állatmodellben tapasztalt eredményeink igazolására.

#### ***Inhalációs szteroidok (ICS), a flutikazon (FP) és a budezonid (BUD) hatásának vizsgálata a C. pneumoniae szaporodására légúti eredetű A549 sejtekben és in vivo egér modellben***

Az ICS-ekkel végzett kísérleteink számos új eredményt tártak fel, amelyek akár jelentőséggel bírhatnak a gyakorló orvosok számára is. Az *in vitro* eredményeink alapján az FP csökkentette a *C. pneumoniae* szaporodását légúti epithel sejtekben, ezért hipotézisünket, hogy az FP gátolja-e a *C. pneumoniae* szaporodását, teszteltük *in vivo*, egér modellben. Kísérleteink során az FP kezelés csökkentette a visszatenyészthető *C. pneumoniae* mennyiségét, ellentétben a BUD-dal. Eredményeinkből kiderült, hogy az FP nem csak a transzkripció szintjén, hanem a fehérje szinten is jelentősen indukálja az IFN- $\gamma$  termelést, ellentétben a BUD-dal. Az FP kezelés során az IFN- $\gamma$ -val párhuzamosan emelkedett a MIG/CXCL9 fehérje termelődése. Ezen túl kísérleteink eredménye szerint az FP-vel kezelt egerek szignifikánsan több IL-17A-t termeltek *C. pneumoniae* fertőzést követően, mely arra utalhat, hogy az IL-17A fokozott termelődése IFN- $\gamma$ -val hozzájárulhat a *C. pneumoniae* gyorsabb eliminálásához. Végül vizsgáltuk a glükokortikoid receptor (GR) és a D-vitamin receptor (VDR) relatív expresszióját, és azt találtuk, hogy az FP kezelt egerekben szignifikánsan nőtt a VDR expresszió a kontroll és a BUD kezelt egerekhez képest. A VDR a chlamydia fertőzött egérsejtek egyik erősen alulszabályozott transzkripciós faktora, ami arra utal, hogy a kísérletünkben a megnövekedett VDR expresszió az egerekben az FP hatásának köszönhető. Ez az eredmény felveti annak valószínűségét, hogy az FP jótékony hatása a VDR aktiválásából is eredhet; egy korábbi tanulmány bebizonyította, hogy a csökkent VDR aktivitás magasabb chlamydia mennyiséggel jár a tüdőben. A D-vitamin segít a bakteriális fertőzések visszaszorításában, és leírták moduláló szerepét a bakteriális fertőzések eradikálásáért felelős adaptív és veleszületett immunválaszban. Kísérleteink alapján fontos lenne az ICS használat és a VDR aktivitás közötti kölcsönhatás további vizsgálata, mivel a D-vitamin pótlás széles körben ajánlott asthmában is.

#### ***A HEC hatása a különböző C. trachomatis szerotípusok szaporodására in vitro és in vivo rendszerben***

A hidroxil-etil cellulóz (HEC) egy általánosan használt gélképző polimer, amely megtalálható fő komponensként a síkosító anyagokban és a terápiás gélekben egyaránt. Annak tisztázására, hogy a HEC

milyen hatással lehet a chlamydia átvitelére, szaporodására, megvizsgáltuk hatását a *C. trachomatis* D és E szerovariánsok tekintetében. A cervicovaginális környezet utánzása céljából vaginális közeget szimuláló folyadékot (szimulánst) használtunk a HEC hígítására és a *C. trachomatis* EB-ék inkubálására. A hüvelyváladék szimuláns pH-ját 4.2-re vagy 7-re állítottuk be, hogy utánozzuk a vaginális környezet normál és megemelkedett pH-ját. A *C. trachomatis* D szaporodásának maximális növekedése 23.7-szeres volt a maximális 1.5 tömeg/térfogat% HEC koncentrációnál. Mérhető, de nem szignifikáns replikációt fokozó tendencia jelentkezett 0.188 tömeg/térfogat% HEC koncentrációig. A HEC pH 7-nél jelentősen fokozta a chlamydia szaporodását. Érdekes, hogy a *C. trachomatis* E szerovariáns esetében a szaporodás maximális növekedését (22.25-szörös és 26.1-szeres pH=4.2-, illetve 7-nél) a második legmagasabb HEC koncentrációnál (0.75 tömeg/térfogat%) figyeltük meg, amely jelzi az eltérő HEC-EB kölcsönhatást a szerovariánsok között. A qPCR eredmények validálása céljából ChlamyCount módszerrel elvégeztük a chlamydia inklúzió számlálást különböző HEC koncentrációknál a vizsgált két szerovariáns esetében. Az inklúzió számok hasonló, bár kevésbé intenzív növekedés fokozódást mutattak, mint a qPCR módszerrel végzett chlamydia genom mérések. Ez a különbség valószínűleg annak köszönhető, hogy a ChlamyCount a chlamydia inklúziók számát, míg a qPCR az inklúziók bakteriális genom tartalmát méri. Az egérkísérleteinkből származó *in vivo* adatok is kimutatták, hogy a HEC szignifikánsan megnöveli a *C. trachomatis* D szerovariáns növekedését az állatok genitális traktusában, miszerint 2.57-szeres növekedést mértünk 3 nappal a fertőzés után. Kísérleteink felhívják a figyelmet a széles körben használt HEC chlamydia szaporodást fokozó hatására.

#### 4.6. A CMV fertőzést kísérő celluláris és humorális immunválasz

*Ebben a témában az alábbi kérdésekre kerestük a választ:*

1. Milyen százalékban mutatnak HCMV IE1-exon4, pp65, pp150, gB és pp28 specifikus CTL (citotoxikus T-lymphocyta) aktivitást az egészséges véradók?
2. Milyen MHC molekulák képesek prezentálni az általunk vizsgált HCMV antigéneket?
3. Milyen fenotípussal rendelkeznek az általunk vizsgált HCMV antigének felismerésére képes CTL-ek?
4. Van-e hatása a bupivakain előkezelésnek a teljes hosszúságú membránkötött (pVR-gB) vagy a szekretált (pVR-gB $\Delta$ tm) gB-vel DNS-immunizált egerekben kialakult ellenanyagválaszra?
5. Befolyásolja-e az intramuscularis oltás módja az alkalmazott pVR-gB $\Delta$ tm által kiváltott immunválaszt egérben?
6. Milyen hatással van a gB alegység (protein) emlékeztető (booster) oltás a gB szekretált formájával (pVR-gB $\Delta$ tm) DNS-immunizált egerek antitest válaszára?
7. Indukálódik-e a pVR-pp65 plazmida DNS-immunizált egerekben CTL válasz; és az IFN- $\alpha$  hogyan befolyásolja a pp65-specifikus CTL és gB-specifikus antitest választ?

#### **A CMV specifikus CTL válasz tanulmányozása egészséges véradókban**

Az általunk tesztelt szeronegatív donorok nem mutattak CTL aktivitást HCMV antigének ellen. A szeropozitív egyének 92%-a mutatott pp65, 76%-a IE1-exon4 specifikus CTL aktivitást, míg a donorok csak 33%-a rendelkezett pp150 és 30%-a gB specifikus CTL kapacitással. Az általunk vizsgált szeropozitív donorok nem mutattak aktivitást a pp28 antigénnel szemben a CTL tesztben. A donorok CTL profilja a vizsgált 27 hónapos periódusban stabil maradt. A donorok erős CTL aktivitása a pp65 és IE1-exon4 antigének ellen korrelált a CTL-ek prekursor frekvenciájával. MHC restrikciós kísérleteink során megállapítottuk, hogy a pp65 prezentáció A1, A2, A28, A68, B7 és B12/44; az IE1-exon4 A1, A2, A3, B7, B8, B18, B70; a pp150 prezentálása pedig A3 és B14 restrikció alá esik. Az effektor sejtek deplécióját

(anti-CD4 vagy anti-CD8 vagy mindkettő) követő citotoxicitási vizsgálatok szerint a pp65 specifikus ölésben a CD8<sup>+</sup> fenotípusú, míg az IE1-exon4 specifikus lízisben mind a CD4<sup>+</sup>, mind a CD8<sup>+</sup> CTL-ek részt vettek. A korábbi vizsgálatok alapján a HCMV domináns antigénjei, melyek kiváltják a specifikus CTL-ek képződését a pp65 és a pp150. Az, hogy a CTL-ek felismerik az exogén úton bejutott pp65 antigént megerősíti, hogy a specifikus CTL-ek már a vírussal fertőzött sejten is hatnak közvetlenül a fertőzés után, még mielőtt megindulna a vírus szaporodása, a virion összeépülése. A tanulmányunkban a 26 szeropozitív donor közül 24 rendelkezett pp65 specifikus CTL-ekkel. A pp65 specifikus CTL-ek ubikvitása a természetes úton HCMV-vel fertőzöttek körében azt sugallja, hogy a pp65 epitópot sokféle HLA molekula prezentálja. A pp65 mellett kísérleteink alapján az IE1-exon4 antigén is fontos CTL targetnek bizonyult, két donorunk esetében nem tudtunk detektálni sem pp65, sem pedig pp150, kizárólag IE1-exon 4 specifikus CTL aktivitást mutattunk ki. Az IE1 szerepe egy esetleges CMV alegység vakcinában a kutatók számára kérdéses, mert a teljes IE1 protein transzaktiváló szereppel bírhat, viszont az IE1-exon4 szegmense nem rendelkezik transzaktiváló hatással, de megőrzi a CTL indukáló képességet. Ezek az eredmények, valamint a HCMV protein specifikus CTL-ek fenotípusának, valamint további prezentáló HLA molekulák azonosítása adatokkal szolgált a CMV fertőzésre kialakult immunválasz jobb megismeréséhez, valamint hozzájárulhat egy olyan vakcina kifejlesztéséhez, mely effektív CTL-eket indukál mind az aktív fertőzés ellen, melyben nem-strukturális és strukturális fehérjék is kifejeződnek, mind pedig látens fertőzést követő reaktivációkor, amikor a nem-strukturális antigének előbb fejeződnek ki, mint a strukturálisak.

#### ***A CMV elleni DNS immunizálás optimalizálása egérmodellben***

A bupivakain előkezelést különféle plazmid DNS-konstrukciókkal - köztük a HIV-1 plazmid-konstrukciókkal végzett immunizálás során alkalmazták, és úgy gondolták, hogy fokozza az immunválaszt az izomrostok szelektív elpusztításával, amelyet a mitotikusan aktív sejtek populációjának növekedése kísér, amit hatékony DNS felvétel és a bejuttatott idegen gén expressziója követ. Kísérleteinkben a bupivakain előkezelés nem növelte a pVR-gB illetve pVR-gBΔtm DNS vakcinára válaszadó egerek számát, illetve az ELISA vagy neutralizáló ellenanyag titereket bármelyik gB formát alkalmazva sem. Kísérleteinkben igazoltuk, hogy a több helyre bejuttatott intramusculáris oltás összevetve az egy helyre történt oltással növeli az antigén felvételének és annak a perifériás immunszervekbe juttatásának lehetőségét a monocyták és a rezidens antigénbemutató sejtek által. Eredményeink alapján a pVR-gBΔtm DNS vakcina szignifikáns ellenanyagválaszt indukált, amely elérve a platót lassan csökkent az idő múlásával, de az első oltás beadása után 6–9 hónappal alkalmazott gB protein oltás (booster) a plato szint fölé képes emelni azt. További eredményeink a pp65-t expresszáló plazmid erős immunogenitását mutatták, 25-50 µg pVR-pp65-tel immunizált egerek kb. 50% -ában CTL válasz indukálódott, ugyanakkor a pp65-specifikus CTL választ mutatott egerek száma nem növekedett a pVR-pp65-tel és a pIFN-α-val (IFN-α-t expresszáló plazmid) együtt oltott csoportokban, sem a pΔRC kontroll plazmiddal oltottokban. Az pIFN-α és a VR-gBΔtm együttes alkalmazása viszont bizonyos dózisosokban fokozta a gB-specifikus antitest választ. Kísérleteink fontos információkkal szolgálnak a CMV elleni DNS vakcinálás körülményeinek optimalizálásával és a napjainkban is a legfontosabb CMV vakcina alegységként számon tartott proteinek immunológiai hatásának vizsgálatával kapcsolatban.



## 5. Az értekezés új megállapításai

1. Kimutattuk, hogy a *C. pneumoniae* fertőzés indukálja az IL-17A kifejeződését mRNS és protein szinten a fertőzött egerek tüdejében és igazoltuk, hogy az IL-17A termelődéséért nagyrészt a CD4<sup>+</sup> sejtek felelősek. Bizonyítottuk, hogy az IL-17A *in vivo* neutralizálása csökkent chemokín termelődéshez és neutrophil granulocytá beáramláshoz, következményesen nagyobb mennyiségű visszatenyészthető chlamydia hozamhoz vezetett. Megállapítottuk, hogy az ismételt *Chlamydia* fertőzések kései szakaszában fokozódik az IL-17E kifejeződése mRNS és protein szinten, és ez a változás élő chlamydia jelenlétét igényelte.
2. A *C. pneumoniae* fertőzéses modellben leírtuk a baktérium DNS produkciójának kinetikáját, mely nemcsak a tüdőben, de a perifériás vérben is nagy kópiaszámban szinte azonnal megjelent a primer és az ismételt fertőzések után is, majd lecsökkent a fertőzés kései szakaszában, viszont a *C. pneumoniae* DNS a tüdőben és a vérben még sokáig perzisztált az egerek egy kis hányadában. Igazoltuk, hogy az IgM ellenanyag a reinfekciók során is újra megjelenik az egerek keringésében. Alacsony IgG2a/IgG1 arányt mértünk a primer fertőzést követően, ezzel szemben magasabb IgG2a/IgG1 arányt a reinfekciók után, ez a primer fertőzés és a reinfekció elkülönítéséhez hasznos markerként szolgálhat.
3. Bizonyítottuk, hogy a *C. trachomatis* szaporodik, bár eltérő kinetikával, és megváltozott génexpressziós mintázattal bél eredetű Caco-2 sejtekben, valamint azt, hogy ezen sejtekben a fertőzés alacsony szintű hBD-2 termelést eredményez, ami hozzájárulhat a patogén gastrointestinális túléléséhez, valamint az onnan történő rekurrens genitális fertőzésekhez.
4. Bizonyítottuk, hogy az ApoB100only/LDLR<sup>-/-</sup> egerek megfertőzhetők *C. pneumoniae*val, és a baktérium RNS-ének kimutatásával az aktívan metabolizáló kórokozó jelenlétét igazoltuk az aortában, valamint kimutattuk, hogy a fertőzés fokozta az atherosclerosis progresszióját normál diéta mellett.
5. Bizonyítottuk, hogy az exogén IFN- $\gamma$  emelte a természetes és az adaptív immunitással kapcsolatos, valamint a direkt anti-chlamydiás hatással rendelkező gének expresszióját chlamydia fertőzött egér epithel sejtekben, bizonyítottuk továbbá, hogy a MIG/CXCL9 anti-chlamydiás hatással rendelkezik, és a hatása függ a koncentrációtól, az időtől és a vizsgált chlamydia törzstől.
6. Kimutattuk, hogy a *C. pneumoniae* fertőzés indukálja az egerek tüdejében a CXC chemokinek expresszióját, és igazoltuk, hogy a MIG/CXCL9 kötődésért *C. pneumoniae* 60 kDa molekulásúlyú proteinje felelős.
7. Génexpressziós, hisztopatológiai, funkcionális valamint *in vivo* neutralizációs vizsgálattal is bizonyítottuk, hogy azIDO kifejeződik és anti-mikrobiális hatással rendelkezik chlamydia fertőzött egerekben.
8. Kimutattuk, hogy a *C. pneumoniae* fertőzött DC szubpopuláció IFN- $\gamma$  termelésre képes, viszont az nem befolyásolja a kórokozó szaporodását a DC-kben.
9. Bizonyítottuk, hogy a chlamydia LcrE proteinnel történt immunizálásra az egerek ellenanyag termeléssel reagálnak, a humorális immunválasz mellett a T-sejtes válasz is aktiválódik, ami Alum adjuváns alkalmazásával is megtörténik. Megállapítottuk továbbá, hogy az LcrE vakcina protektív hatással rendelkezik az immunizált egerekben.

10. Igazoltuk, hogy *C. muridarum* fertőzés során pGP3 és pGP4 specifikus ellenanyagok és T-sejtek képződnek egerekben, és megállapítottuk, hogy a különböző genetikai háttérrel rendelkező egerek a *C. muridarum* fertőzés során különböző formában ismerik fel a pGP3 chlamydia plazmid proteint.
11. Bizonyítottuk, hogy a rekombináns pGP3 és pGP4 proteinnel történő immunizálás protektív, ellenanyag képződéshez és celluláris immunválaszhoz vezet az egerekben, valamint, hogy ez utóbbi felelős elsősorban a visszatenyészthető chlamydia mennyiségének a csökkenésért.
12. Kimutattuk, hogy az általunk vizsgált 11 NCR peptid közül 7 anti-chlamydiás hatással rendelkezik, azonosítottuk a GroEL fehérjét, mint az anti-chlamydiás hatással bíró NCR247 peptid kötéséért felelős ligandot.
13. Kísérletileg igazoltuk, hogy a mukolitikumként gyakran használt NAC *in vitro* és *in vivo* egerekben is fokozza a *C. pneumoniae* szaporodását, Bizonyítottuk, hogy az Ax *in vitro* csökkenti a *C. pneumoniae* szaporodását, viszont a humán dózisonak megfelelő koncentrációban alkalmazva nem befolyásolja a *C. pneumoniae* szaporodását az egerek tüdejében.
14. Megállapítottuk, hogy az asthma kezelésében használt FP, ellentétben a BUD-dal *in vitro* és *in vivo* is csökkenti a *C. pneumoniae* számát, mely összefüggésbe hozható az általa indukált citokinek termelődésével.
15. Igazoltuk, hogy a gél képzőként használt HEC fokozza a *C. trachomatis* D és E szerovariánsok szaporodását *in vitro*, valamint az D szerotípus szaporodását *in vivo* intravaginálisan fertőzött egerekben is.
16. Vizsgálatunk kimutatta, hogy az HCMV IE1-exon4 fehérjéje csaknem ugyanolyan elterjedt CTL célpont, mint a pp65. MHC restrikciós kísérleteink során megállapítottuk, hogy a pp65 prezentáció A1, A2, A28, A68, B7 és B12/44; az IE1-exon4 A1, A2, A3, B7, B8, B18, B70; a pp150 prezentálása pedig A3 és B14 restrikció alá esik. A citotoxicitási vizsgálatok szerint a pp65 specifikus ölésben a CD8<sup>+</sup> fenotípusú, míg az IE1-exon4 specifikus lízisben mind a CD4<sup>+</sup>, mind a CD8<sup>+</sup> CTL-ek részt vehetnek.
17. Kísérleteink alapján a bupivakain előkezelés nem fokozta a CMV gB antigént kódoló DNS vakcina hatékonyságát, az ellenanyagválasz magasabb volt azokban az egerekben, amelyeket a quadriceps három helyén oltottuk, továbbá a pVR-gBΔtm DNS vakcinával alapimmunizált egerekben, a gB alegység booster oltás szignifikánsan növelte a gB specifikus ellenanyagszintet.

## 6. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretném kifejezni mélységes hálámat **Prof. Dr. Gönczöl Évának**, minden Vele kezdődött. Köszönöm, hogy mindig bátorított a tudomány rögzös útjain. Az Ő meglátásai, tanácsai és segítségével nélkül nem lehetnék az, aki vagyok.

Köszönetet mondok **Prof. Dr. Mándi Yvettenek**, aki mint tanszékvezető mindig támogatta munkámat és bátorított a disszertációm megírásában.

Nagy hálával tartozom **Dr. Endrész Valériának**, aki mindenre megtanított a közös laboratóriumi munkánk során. Mindig türelmes és segítőkész volt. Vele töltöttem kutatói életem nagy részét, nagyszerű dolog volt megbeszélni Vele a kísérleteket, sikereket és a kudarcokat. Visszatekintve az elmúlt évekre, az állatházban együtt eltöltött hosszú időszak életem legjobb szakasza volt.

Köszönet illeti kollégámat, **Dr. Virók Dezsőt, Dr. Kis Zoltánt, Dr. Berencsi Klárát, Dr. Gyulai Zsófiát**. Nagyszerű dolog volt velük együtt dolgozni. Köszönetem szeretném kifejezni volt PhD hallgatóimnak **Dr. Balogh Emese Petrának, Dr. Mosolygó Tímeának, Dr. Paróczai Dórának és Dr. Kókai Dávidnak** a sok munkáért, amit befektettek a születendő tudományos közleményekbe és a segítségükért. Külön köszönöm nekik, hogy segítettek a dolgozat formai szerkesztésében, lektorálásában. Köszönöm korábbi fiatal munkatársaim (Dr. Faludi Ildikó, Dr. Raffai Tímea és Dr. Lantos Ildikó) munkáját és segítőkészségét. Hálás vagyok volt diákkörös hallgatóimnak munkájukért.

Szeretném megköszönni Paraginé Zsótér Gizella, Lévai Istvánné, **Müllerné Deák Györgyi és Vigyikánné Váradiné Anikó** asszisztensnők által nyújtott segítséget, akik nélkül a kísérletek nem jöhettek volna létre. Köszönöm továbbá Naszradi Miklósné Piroskának, volt állatgondozónknak, az egérkísérletekben nyújtott munkáját, valamint **Miklósné Bódi Edinának** a mérhetetlenül sok adminisztratív munkát, amit átvállalt tőlem, hogy a dolgozatom megszülethessen.

Hálásan köszönöm az Orvosi Mikrobiológiai Intézet összes munkatársának a segítségét és megértését. Nem tudom kifejezni eléggé köszönetemet kifejezni családomnak, drága **Anyukámnak**, lányaimnak, **Bettinának** és **Anettnak** a támogatásukért, akik mindig feltétel nélkül hittek az anyukájukban, hogy mindenre képes.

## 7. Az értekezés alapját képező *in extenso* közlemények

1. Paróczai, Dóra; Sejben, Anita; Kókai, Dávid; Virók, Dezső P.; Endrész, Valéria; **Burián, Katalin**: Beneficial Immunomodulatory Effects of Fluticasone Propionate in Chlamydia pneumoniae-Infected Mice PATHOGENS 10: 3 p. 338, 13 p. (2021)
2. Raffai Tímea\*, **Burián Katalin\***, Janovák László, Bogdanov Anita, Hegemann Johannes H, Endrész Valéria, Virók DP : Vaginal Gel Component Hydroxyethyl Cellulose Significantly Enhances the Infectivity of Chlamydia trachomatis Serovars D and E ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY (0066-4804 1098-6596): 63 1 Paper e02034-18. 4 p. (2019) \*megosztott elsőszerzőség
3. Virok Dezső P, Raffai Tímea, Kókai Dávid, Paróczai Dóra, Bogdanov Anita, Veres Gábor, Vécsei László, Poliska Szilárd, Tiszlavicz László, Somogyvári Ferenc, Endrész

- Valéria, **Burián Katalin**: Indoleamine 2,3-Dioxygenase Activity in Chlamydia muridarum and Chlamydia pneumoniae Infected Mouse Lung Tissues FRONTIERS IN CELLULAR AND INFECTION MICROBIOLOGY (2235-2988): 9 Paper 192. 12 p. (2019)
4. Lantos I, Virok DP, Mosolygo T, Razga Z, **Burian K**, Endresz V: Growth characteristics of Chlamydia trachomatis in human intestinal epithelial Caco-2 cells PATHOGENS AND DISEASE (2049-632X): 76 3 Paper fty024. 9 p. (2018)
  5. Lantos I, Endrész V, Virok DP, Szabó A, Lu X, Mosolygó T, **Burián K.**: Chlamydia pneumoniae Infection Exacerbates Atherosclerosis in ApoB100only/LDLR-/- Mouse Strain. Biomed Res Int. 2018 Mar 25;2018:8325915. doi: 10.1155/2018/8325915. eCollection 2018. PMID: 29770337
  6. Kókai D, Mosolygó T, Virók DP, Endrész V, **Burián K.**: N-acetyl-cysteine increases the replication of *Chlamydia pneumoniae* and prolongs the clearance of the pathogen from mice. J Med Microbiol. (2018 May);67(5):702-708. doi: 10.1099/jmm.0.000716.PMID: 29521616
  7. Mosolygó T, Faludi I, Balogh EP, Szabó AM, Karai A, Kerekes F, Virók DP, Endrész V, **Burián K**: Expression of Chlamydia muridarum plasmid genes and immunogenicity of pGP3 and pGP4 in different mouse strains INTERNATIONAL JOURNAL OF MEDICAL MICROBIOLOGY (1438-4221 1618-0607): 304 3-4 pp 476-483 (2014)
  8. Balogh EP, Mosolygó T, Tiricz H, Szabó AM, Karai A, Kerekes F, Virók DP, Kondorosi E, **Burián K.**: Anti-chlamydial effect of plant peptides. Acta Microbiol Immunol Hung. 2014 Jun;61(2):229-39. doi: 10.1556/AMicr.61.2014.2.12. PMID: 24939689
  9. Mosolygó T, Korcsik J, Balogh EP, Faludi I, Virók DP, Endrész V, **Burián K.**: Chlamydia pneumoniae re-infection triggers the production of IL-17A and IL-17E, important regulators of airway inflammation. Inflamm Res. 2013 May;62(5):451-60. doi: 10.1007/s00011-013-0596-1. Epub 2013 Feb 6. PMID: 23385305
  10. Mosolygó T, Spengler G, Endrész V, Laczi K, Perei K, **Burián K.**: IL-17E production is elevated in the lungs of Balb/c mice in the later stages of Chlamydia muridarum infection and re-infection. In Vivo. 2013 Nov-Dec;27(6):787-92. PMID: 24292583
  11. Mosolygo T, Szabo AM, Balogh EP, Faludi I, Virok DP, Endresz V, Samu A, Krenacs T, **Burian K**: Protection promoted by pGP3 or pGP4 against Chlamydia muridarum is mediated by CD4 cells in C57BL/6N mice.

VACCINE 32: 40 pp. 5228-5233. , 6 p. (2014)

12. Emese P Balogh, Ildikó Faludi, Dezső P Virók, Valéria Endrész, **Katalin Burián**: Chlamydomphila pneumoniae induces production of the defensin-like MIG/CXCL9, which has in vitro anti-chlamydial activity  
INTERNATIONAL JOURNAL OF MEDICAL MICROBIOLOGY (1438-4221 1618-0607): 301 3 pp 252-259 (2011)
13. **Katalin Burian**, Valeria Endresz, Judit Deak, Zsolt Kormanyos, Attila Pal, David Nelson, Dezso P Virok: Transcriptome Analysis Indicates an Enhanced Activation of Adaptive and Innate Immunity by Chlamydia-Infected Murine Epithelial Cells Treated with Interferon  $\gamma$   
JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES (0022-1899 1537-6613): 202 9 pp 1405-1414 (2010)
14. Faludi I, **Burian K**, Csanadi A, Miczak A, Lu XJ, Kakkar VV, Gonczol E, Endresz V: Adjuvant modulation of the immune response of mice against the LcrE protein of Chlamydomphila pneumoniae  
INTERNATIONAL JOURNAL OF MEDICAL MICROBIOLOGY (1438-4221 1618-0607): 299 7 pp 520-528 (2009)
15. Kis Z, **Burian K**, Tresó B, Acs K, Prohaszka Z, Fust G, Gonczol E, Endresz V.: Inflammatory- and immune responses in relation to bacterial replication in mice following re-infections with Chlamydomphila pneumoniae.  
Inflamm Res. 2008 Jun;57(6):287-95. doi: 10.1007/s00011-007-7124-0.  
PMID: 18516711
16. Kis Z, Tresó B, **Burian K**, Endresz V, Pallinger E, Nagy A, Toth A, Takacs M, Falus A, Gonczol E: Expression of bacterial genes and induction of INF-gamma in human myeloid dendritic cells during persistent infection with Chlamydomphila pneumoniae  
FEMS IMMUNOLOGY AND MEDICAL MICROBIOLOGY (0928-8244 1574-695X): 52 3 pp 324-334 (2008)
17. Kis Z, Sas K, Gyulai Z, Tresó B, Petrovay F, Kapusinszky B, Csire M, Endresz V, **Burian K**, Mandi Y, Vecsei L, Gonczol E.: Chronic infections and genetic factors in the development of ischemic stroke.  
New Microbiol. 2007 Jul;30(3):213-20. PMID: 17802898
18. Virok D, Kis Z, Karai L; Intzedy L; **Burian K**, Szabo A, Ivanyi B, Gonczol E: Chlamydia pneumoniae in atherosclerotic middle cerebral artery  
STROKE (0039-2499 1524-4628): 32 9 pp 1973-1976 (2001)
19. Endresz V, **Burian K**, Berencsi K, Gyulai Z, Kari L, Horton H, Virok D, Meric C, Plotkin S A, Gonczol E: Optimization of DNA immunization against human cytomegalovirus  
VACCINE (0264-410X 1873-2518): 19 28-29 pp 3972-3980 (2001)

20. Gyulai Z, Endresz V, **Burian K**, Pincus S, Toldy J, Cox W I, Meric C, Plotkin S, Gonczol E, Berencsi K: Cytotoxic T lymphocyte (CTL) responses to human cytomegalovirus pp65, IE1-exon4, gB, pp150, and pp28 in healthy individuals: Reevaluation of prevalence of IE1-specific CTLs  
JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES (0022-1899 1537-6613): 181 pp 1537-1546 (2000)

### 7.1. Egyéb *in extenso* közlemények

1. Márió, Gajdács; Marianna, Ábrók; Andrea, Lázár; Katalin, Burián  
Epidemiology and antibiotic resistance profile of bacterial uropathogens in male patients: a 10-year retrospective study  
FARMACIA (BUCHAREST) 69: 3 pp. 530-539., 10 p. (2021)
2. Kókai, Dávid; Paróczai, Dóra; Virok, Dezső Peter; Endrész, Valéria; Gáspár, Renáta; Csont, Tamás; Bozó, Renáta; Burián, Katalin  
Ambroxol Treatment Suppresses the Proliferation of Chlamydia pneumoniae in Murine Lungs  
MICROORGANISMS 9: 4 p. 880, 14 p. (2021)
3. Kenyeres, Bence; Ánosi, Noel; Bányai, Krisztián; Mátyus, Mária; Orosz, László; Kiss, Andrea; Kele, Beatrix; Burián, Katalin; Lengyel, György  
Comparison of four PCR and two point of care assays used in the laboratory detection of SARS-CoV-2  
JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS 293 Paper: 114165, 5 p. (2021)
4. Baaity, Zain; Jamal, Wafaa; Rotimi, Vincent O.; Burián, Katalin; Leitsch, David; Somogyvári, Ferenc; Nagy, Elisabeth; Sóki, József  
Molecular characterization of metronidazole resistant Bacteroides strains from Kuwait  
ANAEROBE 69 Paper: 102357, 5 p. (2021)
5. Kemenesi, Gábor; Tóth, Gábor Endre; Bajusz, Dávid; Keserű, György M; Terhes, Gabriella; Burián, Katalin; Zeghib, Safia; Somogyi, Balázs A. ; Jakab, Ferenc  
Effect of An 84-bp Deletion of the Receptor-Binding Domain on the ACE2 Binding Affinity of the SARS-CoV-2 Spike Protein: An In Silico Analysis  
GENES 12: 2 Paper: 194, 10 p. (2021)
6. Budai-Szűcs, Mária; Ruggeri, Marco; Faccendini, Angela; Léber, Attila; Rossi, Silvia; Varga, Gábor; Bonferoni, Maria Cristina; Vályi, Péter; Burián, Katalin; Csányi, Erzsébet  
Electrospun Scaffolds in Periodontal Wound Healing  
POLYMERS 13: 2 Paper: 307, 15 p. (2021)
7. Erdei, L; Bolla, B; Bozó, R; Tax, G; Urbán, E; Burián, K; Kemény, L; Szabó, K:  
Tumour Necrosis Factor Alpha-induced Protein 3 Negatively Regulates Cutibacterium acnes-induced Innate Immune Events in Epidermal Keratinocytes  
ACTA DERMATO-VENEREOLOGICA 101 Paper: adv00369, 10 p. (2021)

8. Márió, Gajdács; Marianna, Ábrók; Andrea, Lázár; Katalin, Burián: Revival of older antibiotics for the therapy of urinary tract infections: old, but gold Part 1: antimicrobial susceptibility of extended-spectrum B-lactamase-producing and AmpC B-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates  
REVIEWS IN MEDICAL MICROBIOLOGY 32: 1 pp. 51-56., 6 p. (2021)
9. Mukhtar, M; Pallagi, E.; Csóka, I.; Benke, E.; Farkas, Á.; Zeeshan, M.; Burián, K.; Kókai, D.; Ambrus, R.  
Aerodynamic properties and in silico deposition of isoniazid loaded chitosan/thiolated chitosan and hyaluronic acid hybrid nanoplex DPIs as a potential TB treatment  
INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES 165 pp. 3007-3019, 13 p. (2020)
10. Urbán, Szabolcs; Paragi, Gábor; Burián, Katalin; McLean, Gary R; Virok, Dezső P  
Identification of similar epitopes between severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 and *Bacillus Calmette–Guérin*: potential for cross-reactive adaptive immunity  
CLINICAL AND TRANSLATIONAL IMMUNOLOGY 9: 12 Paper: e1227, 8 p. (2020)
11. Márió, Gajdács; Marianna, Ábrók; Andrea, Lázár; Katalin, Burián  
Beta-Haemolytic Group A, C and G Streptococcal Infections in Southern Hungary: A 10-Year Population-Based Retrospective Survey (2008–2017) and a Review of the Literature  
INFECTON AND DRUG RESISTANCE 13 pp. 4739-4749., 11 p. (2020)
12. Gajdács, Márió; Ábrók, Marianna; Lázár, Andrea; Jánvári, Laura; Tóth, Ákos; Terhes, Gabriella; Burián, Katalin  
Detection of VIM, NDM and OXA-48 producing carbapenem resistant Enterobacterales among clinical isolates in Southern Hungary  
ACTA MICROBIOLOGICA ET IMMUNOLOGICA HUNGARICA 67: 4 pp. 209-215. , 7 p. (2020)
13. Gajdács, Márió; Ábrók, Marianna; Lázár, Andrea; Burián, Katalin  
Rezisztenciaviszonyok elemzése *Escherichia coli* és *Klebsiella* spp. húgyúti izolátumokban ismert és újszerű, klinikailag releváns indikátorok felhasználásával: 10 éves retrospektív vizsgálat [Analysis of resistance trends in urinary *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. isolates using known and novel indicators of clinical relevance: a 10-year retrospective study]  
MAGYAR UROLÓGIA 32: 3 pp. 97-102. , 6 p. (2020)
14. Márió, Gajdács; Marianna, Ábrók; Andrea, Lázár; Katalin, Burián  
Increasing relevance of Gram-positive cocci in urinary tract infections: a 10-year analysis of their prevalence and resistance trends  
SCIENTIFIC REPORTS 10 Paper: 17658, 11 p. (2020)
15. Gajdács, Márió; Ábrók, Marianna; Lázár, Andrea; Terhes, Gabriella; Burián, Katalin

- Leclercia adecarboxylata as an emerging pathogen in human infections: a 13-year retrospective analysis in Southern Hungary  
JOURNAL OF INFECTION IN DEVELOPING COUNTRIES 14: 9 pp. 1004-1010. , 7 p. (2020)
16. Furák, József; Paróczai, Dóra; Burián, Katalin; Szabó, Zsolt; Zombori, Tamás  
Oncological advantage of nonintubated thoracic surgery: Better compliance of adjuvant treatment after lung lobectomy  
THORACIC CANCER 11: 11 pp. 3309-3316. , 8 p. (2020)
17. Budai-Szűcs, Mária; Léber, Attila; Burian, Katalin; Kovács, Anita; Berkó, Szilvia; Gács, Attila; Csányi, Erzsébet; Vályi, Péter  
Klórhexidint tartalmazó, kontrollált hatóanyag-leadást biztosító, szubgingiválisan alkalmazható készítmény keménységének és hatóanyag-leadásának vizsgálata [Investigation of hardness and drug diffusion profile of a subgingival drug delivery system for the sustained release of chlorhexidine gluconate]  
FOGORVOSI SZEMLE 113: 3 pp. 82-89. , 8 p. (2020)
18. Bolla, Beáta Szilvia; Erdei, Lilla; Urbán, Edit; Burián, Katalin; Kemény, Lajos; Szabó, Kornélia  
Cutibacterium acnes regulates the epidermal barrier properties of HPV-KER human immortalized keratinocyte cultures  
SCIENTIFIC REPORTS 10: 1 Paper: 12815, 13 p. (2020)
19. HUNgarian COronaVirus-19 Epidemiological Research (H-UNCOVER) investigators (Kollaborációs szervezet); Merkely, Béla; Szabó, Attila J.; Kosztin, Annamária; Berényi, Ervin; Sebestyén, Andor; Lengyel, Csaba; Merkely, Gergő; Karády, Júlia; Várkonyi, István et al.  
Novel coronavirus epidemic in the Hungarian population, a cross-sectional nationwide survey to support the exit policy in Hungary  
GEROSCIENCE: OFFICIAL JOURNAL OF THE AMERICAN AGING ASSOCIATION (AGE) 42: 4 pp. 1063-1074.; 12 p. (2020)
20. Márió, Gajdács ; Marianna, Ábrók; Andrea, Lázár; Katalin, Burián  
Differential epidemiology and antibiotic-resistance of lactose fermenting and non-fermenting Escherichia coli: Is it just a matter of taste?  
BIOLOGIA FUTURA 71: 1-2 pp. 175-182., 8 p. (2020)
21. Márió, Gajdács; Marianna, Ábrók; Andrea, Lázár; Katalin, Burián  
Rothia Bacteremia: a 12-Year Experience at a Tertiary-Care Teaching Hospital in Szeged, Hungary  
INFECTIOUS DISEASES IN CLINICAL PRACTICE 28: 6 pp. 361-365. , 5 p. (2020)
22. Szántó, Kata Judit; Rutka, Mariann; Pigniczki, Daniella; Farkas, Klaudia; Burián, Katalin; Terhes, Gabriella; Molnár, Tamás  
Serological Status of Inflammatory Bowel Disease Patients Before Starting Biological Therapy - Data From a Tertiary Centre of the Best Vaccined Country.



- INFLAMMATORY BOWEL DISEASES 26: 4 Paper: e28, 1 p. (2020)
23. Paróczai, Dóra; Mosolygó, Tímea; Kókai, Dávid; Endrész, Valéria; Virók, Dezső Péter; Somfay, Attila; Burián, Katalin  
Chlamydia pneumoniae Influence on Cytokine Production in Steroid-Resistant and Steroid-Sensitive Asthmatics  
PATHOGENS 9: 2 Paper: 112, 13 p. (2020)
24. Márió, Gajdács; Zoltán, Bátori; Marianna, Ábrók; Andrea, Lázár; Katalin, Burián  
Characterization of Resistance in Gram-Negative Urinary Isolates Using Existing and Novel Indicators of Clinical Relevance: A 10-Year Data Analysis  
LIFE-BASEL 10: 2 Paper: 16, 17 p. (2020)
25. Szöllősi, Andrea; Raffai, Tímea; Bogdanov, Anita; Endrész, Valéria; Párducz, László; Somogyvári, Ferenc; Janovák, László; Burián, Katalin; Virok, Dezső P.  
Correlation between detergent activity and anti-herpes simplex virus-2 activity of commercially available vaginal gels  
BMC RESEARCH NOTES 13: 1 Paper: 52, 6 p. (2020)
26. Budai-Szűcs, Mária; Léber, Attila; Cui, Lu; Józó, Muriel; Vályi, Péter; Burián, Katalin; Kirschweng, Balázs; Csányi, Erzsébet; Pukánszky, Béla  
Electrospun PLA Fibers Containing Metronidazole for Periodontal Disease  
DRUG DESIGN DEVELOPMENT AND THERAPY 14 pp. 233-242., 10 p. (2020)
27. Ábrók, Marianna; Tigyi, Petra; Kostrzewa, Markus; Burián, Katalin; Deák, Judit  
Evaluation of the Results of Group B Streptococcus Screening by MALDI-TOF MS among Pregnant Women in a Hungarian Hospital  
PATHOGENS 9: 1 Paper: 1, 7 p. (2020)
28. Gajdács, M; Ábrók, M; Lázár, A; Burián, K  
Microbiology of urine samples obtained through suprapubic bladder aspiration: A 10-year epidemiological snapshot  
DEVELOPMENTS IN HEALTH SCIENCES 2: 3 pp. 76-78. , 3 p. (2019)
29. Márió, Gajdács; Katalin, Burián; Gabriella, Terhes  
Resistance Levels and Epidemiology of Non-Fermenting Gram-Negative Bacteria in Urinary Tract Infections of Inpatients and Outpatients (RENFUTI): A 10-Year Epidemiological Snapshot  
ANTIBIOTICS 8: 3 Paper: 143, 13 p. (2019)
30. Gajdács, Márió; Ábrók, Marianna; Lázár, Andrea; Burián, Katalin  
Széles spektrumú béta-laktamáz-termelő (ESBL) húgyúti patogének kezelési lehetőségei: tapasztalatok a SZTE Szent-Györgyi Albert Klinikai Központban  
GYÓGYSZERÉSZET 63: 7 pp. 405-411., 7 p. (2019)
31. Márió, Gajdács; Marianna, Ábrók; Andrea, Lázár; Katalin, Burián

- Comparative Epidemiology and Resistance Trends of Common Urinary Pathogens in a Tertiary-Care Hospital: A 10-Year Surveillance Study  
MEDICINA-LITHUANIA 55: 7 Paper: 356, 15 p. (2019)
32. Mándi, Yvette; Endrész, Valéria; Mosolygó, Tímea; Burián, Katalin; Lantos, Ildikó; Fülöp, Ferenc; Szatmári, István; Lőrinczi, Bálint; Balog, Attila; Vécsei, László  
The Opposite Effects of Kynurenic Acid and Different Kynurenic Acid Analogs on Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) Production and Tumor Necrosis Factor-Stimulated Gene-6 (TSG-6) Expression  
FRONTIERS IN IMMUNOLOGY 10 Paper: 1406, 10 p. (2019)
33. Márió, Gajdács; Ilona, Dóczy; Marianna, Ábrók; Andrea, Lázár; Katalin, Burián  
Epidemiology of candiduria and Candida urinary tract infections in inpatients and outpatients: results from a 10-year retrospective survey  
CENTRAL EUROPEAN JOURNAL OF UROLOGY 72: 2 pp. 209-214. , 6 p. (2019)
34. Rédei, Dóra; Kúsz, Norbert; Rafai, Tímea; Bogdanov, Anita; Burián, Katalin; Csorba, Attila; Mándi, Attila; Kurtán, Tibor; Vasas, Andrea; Hohmann, Judit  
14-Noreudesmanes and a phenylpropane heterodimer from sea buckthorn berry inhibit Herpes simplex type 2 virus replication  
TETRAHEDRON 75: 10 pp. 1364-1370., 7 p. (2019)
35. Szabó, Diána; Kovács, Dávid; Endrész, Valéria; Igaz, Nóra; Jenovai, Kitti; Spengler, Gabriella; Tizslavicz, László; Molnár, József; Burián, Katalin; Kiricsi, Mónika et al.  
Antifibrotic effect of mitomycin-C on human vocal cord fibroblasts  
LARYNGOSCOPE 129: 7 pp. E255-E262., 8 p. (2019)
36. Bús, Cs; Kúsz, N; Jakab, G; Senobar, Tahaei SA; Zupkó, I; Endrész, V; Bogdanov, A; Burián, K; Csupor-Löffler, B; Hohmann, J et al.  
Phenanthrenes from *Juncus Compressus* Jacq. with Promising Antiproliferative and Anti-HSV-2 Activities  
MOLECULES 23: 8 Paper: 2085, 13 p. (2018)
37. Rédei, Dóra; Kúsz, Norbert; Sători, Gréta; Kincses, Annamária; Spengler, Gabriella; Burián, Katalin; Barina, Zoltán; Hohmann, Judit  
Bioactive Segetane, Ingenane, and Jatrophane Diterpenes from *Euphorbia taurinensis*  
PLANTA MEDICA: NATURAL PRODUCTS AND MEDICINAL PLANT RESEARCH 84: 9-10 pp. 729-735. , 7 p. (2018)
38. Bogdanov, A; Janovák, L; Lantos, I; Endrész, V; Sebők, D; Szabó, T; Dékány, I; Deák, J; Rázga, Z; Burián, K et al.  
Non-Activated Titanium-Dioxide Nanoparticles Promote the Growth of *Chlamydia trachomatis* and Decrease the Antimicrobial Activity of Silver Nanoparticles  
JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY 123: 5 pp. 1335-1345. , 11 p. (2017)
39. Virok, DP; Eszik, I; Mosolygo, T; Onder, K; Endresz, V; Burian, K

- A direct quantitative PCR-based measurement of herpes simplex virus susceptibility to antiviral drugs and neutralizing antibodies  
JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS 242 pp. 46-52., 7 p. (2017)
40. Parducz, L; Eszik, I; Wagner, G; Burian, K; Endresz, V; Virok, DP  
Impact of antiseptics on Chlamydia trachomatis growth  
LETTERS IN APPLIED MICROBIOLOGY 63: 4 pp. 260-267. , 8 p. (2016)
41. Eszik, I; Lantos, I; Onder, K; Somogyvari, F; Burian, K; Endresz, V; Virok, DP  
High dynamic range detection of Chlamydia trachomatis growth by direct quantitative PCR of the infected cells  
JOURNAL OF MICROBIOLOGICAL METHODS 120 pp. 15-22.: 8 p. (2016)
42. Spengler, G; Takacs, D; Horvath, A; Szabo, AM; Riedl, Z; Hajos, G; Molnar, J; Burian, K  
Efflux Pump Inhibiting Properties of Racemic Phenothiazine Derivatives and their Enantiomers on the Bacterial AcrAB-TolC System.  
IN VIVO 28: 6 pp. 1071-1075., 5 p. (2014)
43. Bogdanov, A; Endresz, V; Urban, S; Lantos, I; Deak, J; Burian, K; Onder, K; Ayaydin, F; Balazs, P; Virok, DP  
Application of DNA chip scanning technology for the automatic detection of Chlamydia trachomatis and Chlamydia pneumoniae inclusions  
ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY 58: 1 pp. 405-413. , 9 p. (2014)
44. Faludi, I; Szabó, A M; Burián, K; Endrész, V; Miczák, A  
Recombinant Mycobacterium smegmatis vaccine candidates  
ACTA MICROBIOLOGICA ET IMMUNOLOGICA HUNGARICA 58: 1 pp. 13-22. , 10 p. (2011)
45. Xinjie, Lu; Daxin, Chen; Valeria, Endresz; Min, Xia; Ildiko, Faludi; Katalin, Burian; Andrea, Szabo; Agnes, Csanadi; Andras, Miczak; Eva, Gonczol  
Immunization with a combination of ApoB and HSP60 epitopes significantly reduces early atherosclerotic lesion in Apobtm2SgyLdlrtm1Her/J mice  
ATHEROSCLEROSIS 212: 2 pp. 472-480., 9 p. (2010)
46. Faludi, I; Csanadi, A; Szabo, AM; Burian, K; Endresz, V; Miczak, A  
Production and purification of low calcium response protein h of chlamydo-phila pneumoniae  
ACTA MICROBIOLOGICA ET IMMUNOLOGICA HUNGARICA 56: 4 pp. 389-397. , 9 p. (2009)
47. Petrovay, F; Heltai, K; Kis, Z; Tresó, B; Gonczol, E; Burian, K; Endresz, V; Valyi-Nagy, I  
Chronic infections and histamine, CRP and IL-6 levels after percutaneous transluminal coronary angioplasty  
INFLAMMATION RESEARCH 56: 9 pp. 362-367. , 6 p. (2007)

48. D, Virok; Z, Kis; L, Kari; P, Barzo; R, Sipka; K, Burian; D E, Nelson; M, Jackel; T, Kerenyi; M, Bodosi et al.  
Chlamydomphila pneumoniae and human cytomegalovirus in atherosclerotic carotid plaques; combined presence and possible interactions  
ACTA MICROBIOLOGICA ET IMMUNOLOGICA HUNGARICA 53: 1 pp. 35-50. , 16 p. (2006)
49. Kis, Z; Pállinger, É; Endrés, V; Burian, K; Falus, A; Berencsi, G; Gönczöl, É  
A soluble factor(s) released by MRC-5 cells early and late after human cytomegalovirus infection induces maturation of monocyte-derived dendritic cells  
ARCHIVES OF VIROLOGY 151: 11 pp. 2277-2287. , 11 p. (2006)
50. Dosa, R; Burian, K; Gonczol, E  
Human cytomegalovirus latency is associated with the state of differentiation of the host cells: an in vitro model in teratocarcinoma cells  
ACTA MICROBIOLOGICA ET IMMUNOLOGICA HUNGARICA 52: 3-4 pp. 397-406. , 10 p. (2005)
51. Heltai, K; Kis, Z; Burian, K; Endresz, V; Veres, A; Ludwig, E; Gonczol, E; Valyi, Nagy I  
Elevated antibody levels against Chlamydia pneumoniae, human HSP60 and mycobacterial HSP65 are independent risk factors in myocardial infarction and ischaemic heart disease  
ATHEROSCLEROSIS 173: 2 pp. 339-346., 8 p. (2004)
52. Kis, Z; Pallinger, E; Endresz, V; Burian, K; Jelinek, I; Gonczol, E; Valyi, Nagy I  
The interactions between human dendritic cells and microbes; possible clinical applications of dendritic cells  
INFLAMMATION RESEARCH 53: 9 pp. 413-423. , 11 p. (2004)
53. Rugonfalvi-Kiss S; Endresz, V; Madsen, H O; Burian, K; Duba, J; Prohaszka, Z; Karadi, I; Romics, L; Gonczol, E; Fust, G: Association of Chlamydia pneumoniae with coronary artery disease and its progression is dependent on the modifying effect of mannose-binding lectin  
CIRCULATION 106: 9 pp. 1071-1076. , 6 p. (2002)
54. Burian, K; Kis, Z; Virok, D; Endresz, V; Prohaszka, Z; Duba, J; Berencsi, K; Boda, K; Horvath, L; Romics, L; Fust G; Gonczol E.: Independent and joint effects of antibodies to human heat-shock protein 60 and Chlamydia pneumoniae infection in the development of coronary atherosclerosis  
CIRCULATION 103: 11 pp. 1503-1508. , 6 p. (2001)
55. Burian, K; Hegyesi, H; Buzas, E; Endresz, V; Kis, Z; Falus, A; Gonczol, E: Chlamydomphila (Chlamydia) pneumoniae induces histidine decarboxylase production in the mouse lung  
IMMUNOLOGY LETTERS 89: 2-3 pp. 229-236. , 8 p. (2003)
56. Burian, K; Berencsi, K; Endresz, V; Gyulai, Z; Valyi, Nagy T; Valyi, Nagy I; Bakay, M; Geng, Y M; Virok, D; Kari, L Hajnal-Papp R, Trinchieri G, Gonczol E: Chlamydia pneumoniae

- exacerbates aortic inflammatory foci caused by murine cytomegalovirus infection in normocholesterolemic mice  
CLINICAL AND DIAGNOSTIC LABORATORY IMMUNOLOGY 8: 6 pp. 1263-1266. , 4 p. (2001)
57. Kis, Z; Burian, K; Virok, D; Kari, G; Endresz, V; Gonczol, E  
Chronic infections and atherosclerosis.  
ACTA MICROBIOLOGICA ET IMMUNOLOGICA HUNGARICA 48: 3-4 pp. 497-510. , 14 p. (2001)
58. Vályi-Nagy, I; Pető, M; Virók, D; Burián, K; Császár, A; Heltai, K; Gönczöl, É  
Kórokozók szerepe az atherosclerosis etiológiájában és patogenezisében [The role of infectious agents in the etiology and pathogenesis of atherosclerosis]  
LEGE ARTIS MEDICINAE 10: 4 pp. 284-290. , 7 p. (2000)
59. Gönczöl, É; Berencsi, K; Endresz, V; Burián, K; Gyulai, Zs; Kari, L; Virók, D  
Új vakcinák lehetősége a jövő század első negyedében  
LEGE ARTIS MEDICINAE 9: 2 pp. 88-95. , 8 p. (1999)
60. Burián, K; Endresz, V; Gönczöl, É  
Cytomegalovírus fertőzések jelentősége Magyarországon  
TRANSZFÚZIÓ 30: 4 pp. 159-165., 7 p. (1997)