



Oktatás, kutatás, gyógyítás: 250 éve
az egészség szolgálatában

SEMMELWEIS EGYETEM

Általános Orvostudományi Kar

Orvosi Mikrobiológiai Intézet

Igazgató: Dr. Szabó Dóra, egyetemi tanár

Bírálat Dr. Burián Katalin „Chlamydia fajok és a cytomegalovírus okozta fertőzések jellemzői és megelőzésük lehetőségei” című MTA értekezéséről

Dr. Burián Katalin „Chlamydia fajok és a cytomegalovírus okozta fertőzések jellemzői és megelőzésük lehetőségei” című 194 oldalas dolgozattal pályázik az MTA doktori címre. A dolgozat kiváló minősége és a dolgozat alapjául szolgáló közlemények mutatják, hogy Dr. Burián Katalin egész tudományos munkásságát a Chlamydia fajok által okozott infekciók pathomechanizmusainak és a kísérő immunológiai folyamatok tisztázása jellemezte, mely az akut fertőzéseken túl, a Chlamydiák szerepének az un. non-communicable betegségek kialakulásában is szerepet játszik. Ezentúl nagy érdeklődéssel fordult a Chlamydia fertőzések terápiás lehetőségei és a Chlamydia fertőzések megelőzésének lehetőségei, elsősorban a védőoltások fejlesztése felé. Ehhez kapcsolódott másik kutatási érdeklődési területe, a human cytomegalovírus megelőzésére kifejlesztendő vakcinák felé irányult.

A disszertáció igényesen összeállított és megszerkesztett munka, melynek logikus felépítése, könnyű követhetősége segíti az olvasót a téma megértésében. A disszertáció szövege gördülékenyen van megfogalmazva, helyesírási vagy fogalmazási hibát alig lehet találni benne. A 194 oldalas disszertáció felépítése világos, logikus és arányos. A grafikonok és illusztrációk kiváló minőségűek. A dolgozat 69 ábrát és 2 táblázatot tartalmaz. A disszertáció formailag a hagyományos szerkezetet követi.

A Bevezetés rész áttekintést nyújt a *Chlamydia* genus különböző speciereinek a *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia muridarum* és *Chlamydia pneumoniae* speciereknek és a Human Cytomegalovírus mikrobiológiai sajátosságairól szaporodási ciklusáról, fehérjéiről, az általuk okozott megbetegedésekről és immunológiai epidemiológiájáról. Ismerteti a Chlamydiák által hordozott plazmidok molekuláris epidemiológiai jellemzőit. Ismerteti továbbá a Chlamydia fertőzések kezelési lehetőségeit, különös tekintettel a különböző támadáspontú antibiotikumokra. A bevezető továbbá áttekintést nyújt a Chlamydia fertőzések megelőzésének lehetőségeiről, a Chlamydia vakcinák különböző generációról. A bevezető segít abban, hogy az olvasó megfelelő kontextusba kerüljön a Chlamydiákkal és a jelölt által kitűzött célokkal. A bevezetőt a Cytomegalovírus által okozott fertőzésekről szóló áttekintés zárja.

Dr. Burián Katalin a kísérleti módszereket megfelelő részletességgel ismerteti, a Chlamydia fertőzés modellezésére használt sejtenyészeteket (HeLa229, Caco-2.), sejtkultúrák fenntartását és vizsgálatait, a Chlamydiák szaporítását, értékmérését, az antigének előállítását és a flow

Cím: 1085 Budapest, Üllői út. 26.

Postacím: 1085 Budapest, Üllői út. 26.; 1428 Budapest, Pf. 2.

Tel.: (06-1) 266-0454

E-mail: titkarsag.gfi@semmelweis-univ.hu

citometriás vizsgálatokat és a Chlamydia plazmidok klónozásának és a fehérjéinek a túltermelésének, valamint tisztításának a bonyolult technikáját. Közelebbről mutatja be az immunológiai paraméterek – citokin, chemokin, interleukinok – meghatározására vonatkozó szerológiai módszereket elsősorban az ELISA technikákat, Western-blot analíziseket, a citotoxikus T-lymphocytá (CTL) aktivitásának mérését, illetve az RNS kivonást követően qPCR segítségével történő meghatározását. A jelölt részletesen bemutatja a humán vérminták és szöveti minták feldolgozását, a *C. pneumoniae* DNS és RNS kivonását érmintákból. Végezetül ismerteti az állatkísérletek kivitelezését, az állatok Chlamydiával, anitgénekkel, CMV-vel történő immunizálását, valamint a különböző szervekben az infektív titerek, a citokin, chemokin szintek meghatározását.

A módszerek részletes bemutatása is jelzi a jelölt széleskörű technikai tudását, hiszen a tenyésztéseken, szerológiai módszereken és a legkülönbözőbb molekuláris tesztek használatán keresztül betekintést nyerünk a jelölt technikai jártasságáról.

A disszertáció eredmények része tartalmilag hat fejezetre tagolódik.

Dr. Burian Katalin az első fejezetben vizsgálta a gazdaszervezetben a különböző Chlamydia fajok által okozott infekciókat és reinfekciókat kísérő immunológiai folyamatokat, többek között az IL-17 citokin családba tartozó citokinek közül, az IL-17A és IL-17E expresszióját. Meghatározta a szerepüket, meghatározta milyen fenotípusú perifériás mononukleáris sejtek termelik a fertőzés során termelődő IL-17A-t. Jellemezte a reinfekciókat követő ellenanyagtermelést és a Chlamydia specifikus celluláris immunválaszt, illetve a Chlamydia gastrointestinális túlélésért felelős mechanizmusokat.

A jelölt az eredmények második fejezetében a chlamydiák kóroki szerepét vizsgálta ischaemiás stroke-ban és atherosclerosisban, az atherosclerosis kialakulásában és progressziójában, különös tekintettel az akut myocardialis infarctusra és a stabil effort anginára. Humán szérum és érfal Chlamydia tartalmának vizsgálata során megállapította, hogy a *C. pneumoniae* jelenléte a középső agyi artéria atheroscleroticus plakkjaiban nem feltétlenül jelenti annak kóroki szerepét, inkább felveti annak a lehetőségét, hogy a *C. pneumoniae* a betegség pathomechanizmusában játszott szerepet. A Chlamydiák kóroki szerepének megerősítésére ApoB100only/LDLR-/- egérmodell használva megerősítette a fertőzés jelentőségét az atherosclerosis kialakulásában.

A jelölt az eredmények harmadik részében az IFN- γ szerepét vizsgálta a Chlamydia fertőzésekben. Kutatásai során megállapította, hogy az IFN- γ kezelés szignifikánsan befolyásolta a Chlamydia által indukált génexpresszió up- és downregulációját. Kimutatta a Chlamydiával fertőzött és IFN- γ - kezelt sejtekben a megemelkedett citokin szekréciót, mely különböző immunsejtek aktivációjához vezetett. Megfigyelte, hogy a humán sejtekben a *C. trachomatis* ellen főként az indolamin 2,3-dioxigenáz aktiválódik.

Vizsgálta továbbá a *C. pneumoniae* fertőzött dendritikus sejtek és az IFN- γ kapcsolatát és megállapította, hogy a *C. pneumoniae* fertőzött dendritikus sejt szubpopuláció IFN- γ termelésre képes, ami hozzájárulhat *C. pneumoniae* elleni immunválasz kialakításához és a *C. pneumoniae*-hoz társított krónikus betegségek immunpatológiájához, viszont nem befolyásolja a kórokozó szaporodását a dendritikus sejtekben.

A jelölt a negyedik részben a *C. pneumoniae* LcrE proteinjének immunogenitását vizsgálta egérmodellben összehasonlítva az Alum adjuváns és a Freund adjuváns alkalmazását. Megállapította, hogy az LcrE immunizáció Alum adjuvánssal kombinálva hasonló védelmet nyújtott *C. pneumoniae* fertőzés ellen, mint a Freund adjuvánssal kombinálva, annak ellenére, hogy különbség mutatkozott az indukált IgG izotípus között, viszont az IFN- γ -t szekretáló sejtek tekintetében nem volt különbség megfigyelhető.

A jelölt vizsgálta továbbá a *C. trachomatis* plazmid proteinjeinek (pGP3 és pGP4) immunogenitását két különböző a BALBc és a C57BL/6N egér modellekben. Felismerte, hogy a gazda genetikai háttere meghatározza, hogy a pGP3-nek a monomer vagy a trimer formája kerül felismerésre. Bizonyította, hogy a pGP3 és pGP4 proteinekkel többszörösen immunizált egerek széruma tartalmaz plazmid protein specifikus ellenanyagokat és a pGP4 proteinnel történt immunizálás hasonló mértékben csökkentette a visszatenyészthető Chlamydia mennyiségét, mint a pGP3 protein. Megállapította, hogy a pGP4 regulátoros proteinnel történt immunizálás hasonló védelmet alakított ki, mint a pGP3 protein, azonban a kialakult védelemért nem a pGP3 és pGP4 specifikus ellenanyagok, hanem a CD4⁺ sejtek voltak felelősek.

A jelölt az ötödik részben a Chlamydiák okozta fertőzések terápiájának lehetőségeit és a szaporodásukat befolyásoló tényezőket vizsgálta. Dr. Burián Katalin vizsgálatai során 11 növényi eredetű peptid *C. trachomatis* ellenes hatását vizsgálta, melyek közül hét rendelkezett anti-chlamydiás hatással, továbbá azonosította a legerősebb anti-chlamydiás hatással bíró NCR247peptidet és a kötődésért felelős 60 kDa-os GroEL (Hsp60) Chlamydia fehérjét. Ennek a fehérjének a szerepét megerősítette, hogy a *C. trachomatis*-sal fertőzött betegek 80-90%-a hordozott GroEL specifikus ellenanyagot és a Chlamydia GroEL ellenes immunválasz korrelált a humán megbetegedések súlyosságával.

A jelölt vizsgálatai során kimutatta, hogy az extracelluláris pathogénnel szemben antimikrobiális hatással bíró N-acetil-cisztein mukolitikum, a *C. pneumoniae* szaporodását nem gátolta, hanem *in vitro* és *in vivo* egyaránt fokozta az OmcB redukálásán keresztül fokozott gazdasejthez történő kapcsolódás. Ezzel szemben az Ambroxol mukolitikum szignifikáns anti-chlamydiás hatást mutatott *in vitro* az indolamin 2,3-dioxigenáz expressziójának fokozása révén, de nem befolyásolta a baktériumok sejthez való kötődését.

A jelölt vizsgálta továbbá a flutikazon és a budezonid hatását a *C. pneumoniae* szaporodására sejtkultúrán és egér modellben. Az eredményei azt mutatták, hogy a flutikazon kezelés csökkentette a visszatenyészthető *C. pneumoniae* mennyiségét, indukálta fehérje szinten a IFN- γ termelést, megemelte a MIG/CXCL9 fehérje termelődését, az IL-17A termelést fokozta és a D-vitamin receptor expresszióját fokozta.

Dr. Burián Katalin vizsgálta a síkosító anyagokban és a terápiás gélekben megtalálható hidroxil-etil cellulóz hatását a különböző *C. trachomatis* szerotípusok szaporodására *in vitro* és *in vivo* rendszerben és eredményei alapján a hidroxil-etil cellulóz szignifikánsan növelte a *C. trachomatis* D szerovariáns növekedését mind *in vitro* és *in vivo* egyaránt.

A disszertáció hatodik részében a CMV fertőzéseket kísérő celluláris és humorális immunválaszokat jellemezte a jelölt. Egészséges véradókban a CMV specifikus citotoxikus T-lymphocita aktivitást vizsgálta human CMV antigének ellen és a szeropozitív egyének 92%-ában pp65, 76%-ában pedig IE1-exon4 specifikus CTL aktivitást detektált, azonban a donoroknak csak 33%-a rendelkezett pp150 és 30%-a gB specifikus CTL kapacitással.

Megállapította, hogy a humán CMV domináns antigénjei a pp65 és a pp150 váltják ki a specifikus CTL-ek képződését, azonban az IE1-exon4 antigént is fontos CTL targetként azonosította a jelölt.

A jelölt optimalizálta a CMV elleni DNS immunizálást egérmodellben és megállapította, hogy a pVR-gB illetve pVR-gB Δ tm DNS vakcinára az immunológiai válaszadók számát a bupivakain nem növelte, azonban az egyszerre több helyre bejutatott intramuscularis oltás viszont igen. Továbbá, a pVR-gB Δ tm DNS vakcina szignifikáns ellenanyag választ indukált. Sem a pVR-pp65-tel és a pIFN- α -val (IFN- α -t expresszáló plazmid) együtt oltott csoportokban, sem a p Δ RC kontroll plazmiddal oltottakban a pp65-specifikus CTL választ mutatott egerek száma nem növekedett. Az pIFN- α és a VR-gB Δ tm együttes alkalmazása viszont bizonyos dózisokban fokozta a gB-specifikus antitest választ. Burián Katalin kísérletei fontos információkkal szolgálnak a CMV elleni DNS vakcinálás körülményeinek optimalizálásával és a legfontosabb CMV vakcina alegységként számontartott proteinek immunológiai hatásának vizsgálatával kapcsolatban.

A jelölt új eredményei:

1. Burián Katalin bebizonyította, hogy a *C. pneumoniae* fertőzés idézte elő a CD4+ sejtek indukálta IL-17A termelést a tüdőben, azonban az IL-17A *in vivo* neutralizálása csökkent chemokin termelődéshez és neutrophil granulocytá beáramláshoz vezet. Rámutatott arra, hogy az ismétlődő Chlamydia fertőzések kései szakaszában párhuzamosan fokozódik az IL-17E kifejeződése is.
2. Meghatározta a *C. pneumoniae* fertőzés kinetikáját és igazolta, hogy *C. pneumoniae* DNS mind a tüdőben, mind a vérben nagy mennyiségben kimutatható mind primer, mind ismételt fertőzések esetében is. Igazolta továbbá a reinfekciók során az IgM ellenanyag ismételt megjelenését. Rámutatott arra, hogy a magasabb IgG2a/IgG1 arány hasznos marker a primer fertőzések és a reinfekciók elkülönítésében.
3. Bizonyította, hogy a *C. trachomatis* képes szaporodni a bél eredetű Caco-2 sejtekben, ahol a fertőzés alacsony szintű hBD-2 termelést eredményez, így hozzájárulva a *C. trachomatis* gastrointestinális túléléséhez és a rekurrens genitális fertőzések kialakulásához.
4. Bizonyította, hogy az ApoB100only/LDLR $^{-/-}$ egerek megfertőzhetők *C. pneumoniae*-val, és az aortafalban aktív kórokozó jelenlétét igazolta, mely még normál diéta mellett is fokozta az atherosclerosis progresszióját.
5. Megerősítette, hogy a MIG/CXCL9 anti-chlamydiás hatással rendelkezik, és a hatása függ a koncentrációtól, az időtől és a vizsgált Chlamydia törzstől, továbbá, hogy a MIG/CXCL9 kötődésért *C. pneumoniae* 60 kDa molekulásúlyú proteinje felelős.
6. Igazolta, hogy a Chlamydia LcrE proteinnel történt immunizálásra az egerek ellenanyag termeléssel reagálnak, a humorális immunválasz mellett a T-sejtes válasz is aktiválódik és protektív hatással rendelkezik az immunizált egerekben.
7. Igazolta, hogy *C. muridarum* fertőzés során pGP3 és pGP4 specifikus ellenanyagok és T-sejtek képződnek egerekben, illetve, hogy a rekombináns pGP3 és pGP4 proteinnel történő immunizálás protektív ellenanyag képződéshez és celluláris immunválaszhoz vezet az egerekben.

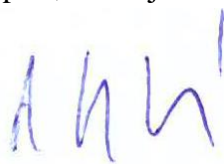
8. Kimutatta, hogy a legerősebb anti-chlamydiás hatással bíró növényi eredetű NCR247 peptid kötéséért felelős ligand a GroEL fehérje.
9. Igazolta, hogy a mukolitikumként gyakran használt N-acetil-cisztein *in vitro* és *in vivo* egerekben is fokozza a *C. pneumoniae* szaporodását. Bizonyította, hogy az ambroxol *in vitro* csökkenti a *C. pneumoniae* szaporodását, viszont a humán dózisonak megfelelő koncentrációban alkalmazva nem befolyásolja a *C. pneumoniae* szaporodását az egerek tüdejében.
10. Megállapította, hogy az asthma kezelése során használt flutikazon-propionát *in vitro* és *in vivo* is csökkenti a *C. pneumoniae* számát, mely összefüggésbe hozható az általa indukált cytokinek termelődésével.

Kérdéseim a jelölthöz:

1. Az N-acetil-cisztein hatását a *C. pneumoniae* szaporodására a humán gyógyászatban alkalmazott koncentrációban figyelték-e meg? Az eredmények alapján érdemes lenne ezt a megfigyelést szakmai javaslatban megfogalmazni. Történt-e az eredmények alapján ilyen jellegű lépés?
2. Történtek-e arra vonatkozó vizsgálatok, kísérletek, hogy az Ambroxol szerkezetét, farmakokinetikáját megváltoztatva, a hatékonyságát növelve, kisebb koncentrációban is hatékony legyen, mint potenciális Chlamydia ellenes szer?
3. Nagyon ígéretes eredményei vannak a jelöltnek a rekombináns pGP3 és pGP4 proteinnel történő immunizálással kapcsolatban. Történtek-e human kísérletek, klinikai vizsgálatok ennek a hatékonyságának a tesztelésére embereken?
4. Ugyanez a kérdés CMV vakcinára vonatkozóan?
5. Nagyon érdekes eredmény, hogy a NCR247 erős anti-chlamydiás hatással rendelkezik. Milyen indikációban látja a jelölt a z NCR247 helyét a jövőben?
6. Kérem a jelöltet, hogy hasonlítsa össze a BALBc és C57BL/6N egér modellek immunológiai és egyéb tulajdonságait, illetve ismertesse, hogy ezek milyen mértékben felelősek az egér fajokban megfigyelt különböző immunológiai hatásokért?
7. Kérem a jelöltet, hogy ismertesse a D-vitamin szerepét a Chlamydia fertőzések lefolyásában és megelőzésében.

Dr. Burián Katalin a különböző Chlamydia fajok pathomechanizmusában, immunológiai hátterében, terápiás és vakcina fejlesztési kutatásaiban jelentős szerepet játszott. A dolgozat Dr. Burián Katalin kiemelkedő tudományos életművét mutatja be. Dr. Burián Katalin MTA doktori munkájának nyilvános vitára bocsátását, annak elfogadását és az MTA doktori cím odaítélését messzemenően támogatom.

Budapest, 2024. január 6.



Dr. Szabó Dóra
egyetemi tanár, az MTA doktora