dc_1937_21

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

Chlamydia fajok és a cytomegalovírus okozta fertőzések jellemzői és megelőzésük lehetőségei

Dr. Burián Katalin

Szegedi Tudományegyetem
Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar
Orvosi Mikrobiológiai Intézet

Szeged

2021

Tartalomjegyzék

Rövidítésjegyzék 3

1. Bevezetés 6

2. Anyagok és módszerek 27

3. Célkitűzések 50

4. Eredmények és megbeszélés 51

4.1. A különböző chlamydia fajok által okozott infekciókat és reinfekciókat kísérő immunológiai változások a gazdaszervezetben 51

4.2. A chlamydiák szerepe krónikus betegségekben 74

4.3. Az IFN-γ szerepe a chlamydia fertőzésekben 82

4.4. A chlamydiák okozta fertőzések megelőzésének lehetőségei 112

4.5. A chlamydiák okozta fertőzések terápiájának lehetőségei és a szaporodását befolyásoló tényezők 128

4.6. A CMV fertőzést kísérő celluláris és humorális immunválasz 143

5. Az értekezés új megállapításai 151

6. Köszönetnyilvánítás 155

7. Irodalomjegyzék 156

8. Az értekezés alapját képező *in extenso* közlemények 183

9. Scientometriai adatok 193

Rövidítésjegyzék

1-MT	1-methyltryptophan (1-metil-triptofán)
AB	aberrant body (aberráns test)
Alum	alumínium-hidroxid
AMP	antimikrobiális peptid
ATCC	American Type Culture Collection
BAL	bronchoalveolaris lavage
BALT	bronchus-associated lymphoid tissue (bronchus-asszociált limfoid szövet)
BSA	bovine serum albumin (bovin szérum albumin)
BUD	budezonid
CMV	cytomegalovírus
C. muridarum	*Chlamydia muridarum*
C. pneumoniae	*Chlamydia pneumoniae*
C. trachomatis	*Chlamydia trachomatis*
CAD	coronary artery disease (koronária betegség)
CAP	community acquired pneumonia (közösségben szerzett tüdőgyulladás)
cHsp60	chlamydia heat schock protein (chlamydia hősokk fehérje) 60
COPD	chronic obstructive pulmonary disease (krónikus obstruktív tüdőbetegség)
CPAF	chlamydia protease-like activity factor
CTL	citotoxikus T-lymphocyta
DAB	diaminobenzidine
DC	dendritic cell (dendritikus sejt)
EB	elemi test
EBV	Epstein-Barr vírus
E. coli	*Escherichia coli*
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ELISpot	enzyme-linked immunosorbent spot
ELR	glutamin-leucin-arginin motívum
FACS	fluorescence-activated cell sorting (áramlási citometria)
FEV1	forced expiratory volume in one second (erőltetett kilégzési másodperc-térfogat)
FITC	fluorescein isothiocyanate
FP	flutikazon-propionát
GAG	glükózaminoglikán
gB	glikoprotein
G-CSF	granulocyte colony-stimulating factor (granulocyta kolónia stimuláló faktor)
GM	geometric mean (geometriai átlag)
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (granulocyta-macrophág kolónia stimuláló faktor)
GSH	glutathione (glutation)

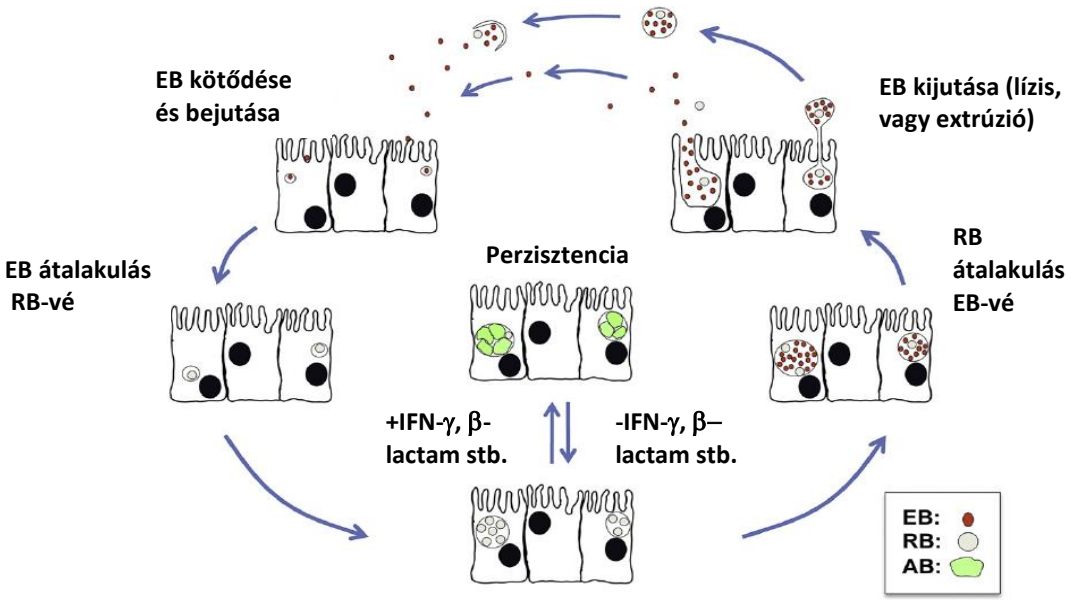
GTPase	guanosine triphosphatase (guanozin trifoszfatáz)
GR	glükokortikoid receptor
HAART	Highly Active Antiretroviral Therapy
hBD-2	humán beta-defenzin-2
HCMV	humán cytomegalovírus
HDC	hisztidin dekarboxiláz
HDL	high-densitiy lipoprotein
HEC	hidroxi-etil-cellulóz
HLA	human leukocyte antigen (humán leukocyta antigén)
HPLC	high pressure liquid chromatography (nagy teljesítményű folyadékkromatográfia)
HRP	horseradish peroxidase (torma-peroxidáz)
Hsp	heat shock protein (hősokk fehérje)
HSV-1	herpes simplex vírus-1
ICS	inhalációs kortikoszteroid
iDC	immature dendritic cell (éretlen dendritikus sejt)
IDO	indoleamine 2,3-dioxygenase/indolamin 2,3-dioxigenáz
IE-1-Exon4	immediate early-1-exon4 protein
IFN-γ	interferon-gamma
IFU	inclusion forming unit (inklúzió formáló egység)
IL	interleukin
iNOS	inducible nitric oxide synthase (indukálható nitrogén-monoxid szintáz)
IP-10	interferon-gamma-inducible protein 10
IRG	interferon regulated gene
ITAC	interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant
JAK1	Janus kináz 1
KEGG	Kyoto encyclopedia of genes and genomes
K. pneumoniae	*Klebsiella pneumoniae*
KC	keratinocyte derived chemokine (keratinocyta eredetű chemokin)
LC-MS/MS	liquid chromatography tandem mass spectrometry
LDL	low-density lipoprotein (alacsony sűrűségű lipoprotein)
LGV	lymphogranuloma venereum
L. monocytogenes	*Listeria monocytogenes*
LIX	LPS-induced CXC chemokine
LPS	lipopolysaccharide (lipopoliszacharid)
M. bovis	*Mycobacterium bovis*
M. pneumoniae	*Mycoplasma pneumoniae*
MACS	Magnetic Cell Sorting (mágneses sejtszeparálás)
MBL	mannose binding lectin (mannóz-kötő lektin)
MHC	major histocompatibility complex (fő hisztokompatibilitási komplex)
MIG	monokine induced by interferon-γ
MIP-2	macrophage inflammatory protein 2
MMP-9	matrix metalloproteinase-9

MOMP	major outer membrane protein (fő külső membránfehérje)
MoPn	*Chlamydia trachomatis* mouse pneumonitis
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NAC	N-acetyl-cysteine/N-acetil-cisztein
NAAT	nucleic acid amplification test (nukleinsav amplifikációs teszt)
NCR	nodule-specific cysteine-rich peptide (gümőspecifikus ciszteinben gazdag peptid)
NF-κB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cell
NK	natural killer cell (természetes ölősejt)
nPCR	nested polymerase chain reaction (fészkes polimeráz láncreakció)
OD	optical density (optikai denzitás)
omp	outer membrane protein (külső membrán protein)
ORF	open reading frame (nyitott leolvasási keret)
PBMC	peripheral blood mononuclear cell (perifériás mononukleáris sejt)
PBS	phosphate buffered saline
PCA	principal component analysis (fő komponens analízis)
PCR	polymerase chain reaction (polimeráz láncreakció)
PDGF	platelet-derived growth factor
PE	phycoerythrin
PFU	plaque forming unit (plakk formáló egység)
PID	pelvic inflammatory disease (krónikus kismedencei gyulladás)
PHA	phytohemagglutinin (fitohemagglutinin)
Pmp	polimorphic membrane protein (polimorf membrán fehérje)
pp28,65, 150	phosphoprotein28, 65, 150
PZ	plaszticitási zóna
qPCR	quantitative polymerase chain reaction (kvantitatív polimeráz láncreakció)
RB	retikuláris test
SD	standard deviáció
SDS	sodium dodecyl sulphate
SFC	spot forming cell (folt formáló sejt)
SPG	sucrose-phosphate-glutamate buffer
TGF-β	transforming growth factor beta
Th1, Th2, Th17	T helper lymphocyta 1, 2, 17
TLR	Toll-like receptor
TNF-α	tumor necrosis factor-α
TRIC	trachoma and inclusion conjunctivitis
TTSS	type three secretion system (III. típusú szekréciós rendszer)
VDR	vitamin D receptor (D-vitamin receptor)
VLDL	very low density lipoprotein
WHO	World Health Organization
ZBP1	Z-DNA binding protein 1 (Z-DNS kötő protein 1)

1. Bevezetés

A *Chlamydiaceae* család egyetlen genusa, a *Chlamydia* mellett 1999-ben leírásra került egy újabb, a *Chlamydophila* genus. A család tagjait a 16S és a 23S riboszomális RNS-ük, a genomjuk, az elektronmikroszkópos képük és az antibiotikum rezisztenciájuk alapján sorolták új nemzetségekbe. Így került a *Chlamydia pneumoniae (C. pneumoniae)* a *Chlamydophila* genusba, a *Chlamydophila pecorum*, a *Chlamydophila psittaci*, a *Chlamydophila abortus*, a *Chlamydophila felis* és a *Chlamydophila caviae* mellé. A *Chlamydia* genusba a *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*), a *Chlamydia suis* és a *Chlamydia muridarum*ot *(C. muridarum)* sorolták [1]. Az új osztályozási rendszer sok ellenzőre talált, és tudományos vitákat szült a chlamydia kutatók körében, ennek hatására egy 2015-ös megegyezés alapján a *Chlamydophila* nemzetségbe sorolt fajokat visszanevezték, így ma már ismét a *Chlamydia* elnevezés szabályos a tudományos közleményekben [2]. 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 és C szerovariánsok, valamint a *C. trachomatis* D-K szerovariánsok, melyek a genitális fertőzésekért felelősek. A másik biovariáns az LGV (lymphogranuloma venereum), ebbe a csoportba tartoznak a *C. trachomatis* L1-L3 szerovariánsai, 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 egyéb krónikus kórképekben betöltött szerepének tisztázására.

A *Chlamydia* genus tagjai Gram szerint negatívan festődő, obligát intracelluláris, pilussal nem rendelkező, nem mozgó baktériumok. Jellegzetes bifázisos fejlődési cikluson mennek keresztül a gazdasejtben **(1. ábra).** A spóraszerű elemi test (EB), mely metabolikusan inaktív és fertőzőképes, a sejtbe phagocytosis révén jut be. Az endosomában levő EB rezisztens az acidifikációra, valamint megakadályozza a phagolysosoma kialakulását és egy speciális burokban, az inklúzióban folytatja fejlődését. Az inklúzió a sejtmag, a Golgi és az endoplazmás retikulum közelében fejlődik, mivel az inklúzió növekedéséhez szüksége van szfingomielinre. Az inklúzió kifejlődése után az EB metabolikusan aktív retikuláris testté (RB) alakul, amely a gazdasejt anyagait és energiaforrásait (ATP) felhasználva a zárványban szaporodik bináris hasadással. Az RB-k általában 8-12 osztódáson mennek keresztül, majd aszinkron módon átalakulnak EB-kké. A transzformációt előidéző mechanizmus még nem pontosan ismert. Az utódsejtek fertőzőképes EB-kké alakulva sejtlízis vagy extrúzió következtében szabadulnak ki. A teljes szaporodási ciklus 48-72 óráig tart, speciestől függő módon.



1. ábra. *A chlamydiák szaporodása. EB-elemi test, RB-retikuláris test, AB-aberráns test (Schoborg, R. V. Chlamydia persistence – a tool to dissect chlamydia–host interactions. Microbes Infect.* ***13,*** *649–662 2011).*

Az utóbbi évtizedekben nyilvánvalóvá vált, hogy a chlamydiák életciklusa sokkal komplexebb, mint a fent ismertetett bifázisos fejlődési ciklus. Galasso már 1961-ben leírta, hogy penicillin kezelés hatására a chlamydia életben tartható nem fertőző formában, akár 9 hónapig is sejtkultúrában, és az antibiotikum eltávolítása után a kórokozó visszaalakul fertőzőképes EB-vé [3]. A transzmissziós elektronmikroszkópos (TEM) analízis során, a penicillinnel kezelt és chlamydiával fertőzött sejtben jellegzetes aberráns testek voltak megfigyelhetők. A penicillin kezelés megakadályozta az RB-k EB-kké alakulását. Az RB-k megnagyobbodtak, szabálytalan alakot öltöttek és az elektrondenzitásuk is csökkent [4]. Fontos, hogy ez az aberráns, perzisztens chlamydia életképes, amit a nem processzálódó 16S rRNS folyamatos szintézise és a genomikus DNS replikációja is mutat. Nagyon sokféle stimulus képes a perzisztencia kialakítására. Talán a legjobban jellemzett az interferon-γ (IFN-γ) és a penicillin hatására kialakult chlamydia perzisztencia modell, de ezeken kívül aberráns test keletkezését indukálhatja a chlamydia bakteriofág fertőzése; hősokk kezelés; aminosav, cukor vagy vas megvonás. Ezek a stimulusok nem befolyásolják a chlamydia életciklusát, ha az EB érése már megkezdődött az RB-ből. A chlamydiák képesek a monocyták, valamint más permanens sejtkultúrák perzisztens fertőzésére is. Az utóbbi években számos új chlamydia perzisztencia modellt írtak le: cigarettafüst komponensek, extracelluláris adenosin indukálta, valamint koinfekció (*herpes simplex vírus*sal (HSV) vagy *porcin epidemic diarrhea vírus*sal) is képes a perzisztens állapot kialakítására [5].

1.1. *C. trachomatis*

1.1.1. A C. trachomatis mikrobiológiai sajátosságai, fehérjéi

A *C. trachomatis*nak 18 szerovariánsa ismeretes a nagy külső membránproteinjének (MOMP) immunreaktivitása és az *ompA* gén (MOMP proteint kódolja) polimorfizmusa alapján. A MOMP a külső membrán szárazanyag tartalmának 60 %-át adja, molekulasúlya 40 kDa [6], és elengedhetetlen a trimer struktúrák kialakításával a kórokozó szerkezeti integritásának megőrzésében [6][7]. A MOMP fontos szerepet játszik variabilitásának, a felszíni elhelyezkedésének és antigén tulajdonságának köszönhetően a fertőzés pathogenesisében. Néhány tanulmányban mint feltételezett cytoadhesin szerepel, mivel serkenti a nem specifikus kapcsolatot a gazdasejttel [8]. Ezenfelül a MOMP species- és szerovariáns-specifikus epitópokat is tartalmaz, melyek képesek a humorális és a celluláris immunválasz kiváltására, és ez a tény ezt a domináns fehérjét a potenciális vakcina és terápiás stratégiák középpontjába emelte [9]. A III-as típusú szekréciós rendszerek (TTSS) olyan struktúrák, melyek kapcsolatot teremtenek a pathogén és a gazdasejt között, majd segítségükkel az effektor proteinek a gazdasejtbe injektálódnak, segítve az inváziót, az intracelluláris túlélést, valamint megváltoztathatják a celluláris funkciókat [10]. A legtöbb pathogénben a strukturális és effektor géneket magában foglaló TTSS rendszer a kromoszóma pathogenitási szigeteiben csoportosul [11]. Ez nem igaz a chlamydia TTSS rendszerére, mely szétszórva helyezkedik el 10 operonban [12].

A *C. trachomatis* lipopolysaccharid (LPS) Lipid A része penta-acetilált és az átlagosnál hosszabb zsírsavakat tartalmaz [13], ennek köszönhető a gyenge macrophág aktiváló képessége [14]. Az még vita tárgya, hogy a chlamydia LPS a Toll-like receptor 2 (TLR2) vagy a TLR4 pathogén mintázat felismerő receptoron szignalizál-e. A chlamydia LPS-t már régen felismerték mint genusspecifikus antigént, így a kórokozó azonosításában nagy szerepet játszik [15]. Leírtak továbbá egy chlamydia cytotoxinnak gondolt toxint [16]. A cytotoxin gének polimorfizmusa alapján el lehet különíteni az oculáris és a genitális izolátumokat [17]. A *C. trachomatis* hősokk fehérjéinek (Hsp) (GroEL és GroES homológok) és az ellenük kialakult gazdaszervezeti immunválasznak fontos szerepet tulajdonítanak a kórokozó által okozott betegségekben. A chlamydia GroEL a TLR-kon keresztül szignalizál [18] és ennek köszönhetően a gyulladás potenciális kiváltója a chlamydia okozta betegségekben. A chlamydiák polimorf külső membrán protein (*Pmp*) 9 génjét Stephens írta le [19]. A Pmp család összes génje (*PmpA-I*) kifejeződik, és különböző molekulasúlyú proteinek kódolásáért felelősek. A 9 tagú géncsalád a *C. trachomatis* teljes kódoló kapacitásának a 14%-át teszi ki [20]. A chlamydiák Pmp proteinjeinek pontos funkciója még nem teljesen tisztázott. Néhány protein olyan kulcsmotívumokat tartalmaz, mint az autotranszporter proteinek [21]. Ez az autotranszport által közvetített folyamat a Gram-negatív baktériumokban mint V-ös típusú szekréciós rendszer működik. Több Pmp fehérje (Pmp D, E, G és H) kimutatható az EB-k felszínén. A Pmp B, D és H erősen immunogén és proinflammatorikus immunválaszt indukál [22].

1.1.2. A C. trachomatis okozta megbetegedések

A *C. trachomatis* A, B, Ba C szerovariánsok okozzák a trachomát, a conjunctiva gyulladásos megbetegedését, amely kezelés hiányában vakságot eredményezhet [23]. A WHO becslése szerint a *C. trachomatis* ezen típusaival kb. 40 millió ember fertőzött a világon és mintegy 1,3 millió ember vesztette el látását a fertőzés következtében [24]. Napjainkban a *C. trachomatis* D-K okozta genitális fertőzés a leggyakoribb szexuális úton terjedő bakteriális infekció 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 [25]. Mivel a kezeletlen fertőzések hosszú távon okoznak problémát pl. infertilitást, ektópiás terhességet, a chlamydia a népegészségügyi kontroll programok középpontjába került az elmúlt két évtizedben. 2002-ben a becslések szerint a *C. trachomatis* által okozott betegségek kézzelfogható költségei az USA-ban meghaladták a 2.6 milliárd dollárt [26].

A *C. trachomatis* az epithelium egyrétegű hengerhámsejtjeit fertőzi meg nők esetén az endocervixben, illetve férfiaknál az urethrában. A mucosális felszínen intenzív gyulladás alakul ki, melyet erythema, oedema és mucosus váladék jellemez, ami nőkben mucopurulens cervicitishez, férfiakban pedig nem-gonococcális urethritishez vezet. A helyi gyulladás ellenére a *C. trachomatis* fertőzések a nők 70-90%-ában, és a férfiak 30-50%-ában szubklinikusan zajlanak [27]. Az aszimptomatikus módon fertőzött nők esetén a vaginális vizsgálat során mucopurulens endocervicális váladék, hipertrófiás cervicális ektópia és sérülékenység tapasztalható [28]. Azok a nők, akiknek szimptomatikus megbetegedésük van, dysuriára, rendellenes folyásra, abnormális menstruációs vérzésre és alhasi fájdalomra panaszkodnak leginkább. A kezeletlen nőkben a fertőzés továbbterjed az endometriumon át a petevezetékekre, és krónikus kismedencei gyulladáshoz (PID), méhen kívüli terhességhez, infertilitáshoz vezethet [29].

A chlamydiák pathogenesisének *celluláris paradigmája* szerint a chlamydiák elsődleges célsejtjei, az epithelsejtek indítják el és tartják fenn a gazdaszervezet immunválaszát [30]. Chemokineket szekretálnak, melyek odacsalogatják a leukocytákat a fertőzés helyére, valamint cytokineket termelnek, melyek indukálják és fokozzák a celluláris választ [31], és ezek a mediátorok kiválthatják a környező szövetek direkt sérülését. Reinfekciók során a gazdasejtből felszabaduló chemokinek odavonzzák a chlamydia specifikus immunsejteket, melyek felerősítik az immunválaszt. A fertőzött sejtekből felszabaduló proteázok, alvadási faktorok, növekedési faktorok, valamint az odaérkező gyulladásos sejtek szöveti sérülésekhez végül hegesedéshez vezethetnek, ami a chlamydia okozta petevezetékgyulladásnak a legfőbb jellemzője. A celluláris paradigma nem tesz különbséget a természetes immunitás sejtes elemei (neutrophil sejtek, monocyták) által okozott károsítás és az adaptív immunválasz, a lymphocyták okozta károsodás között, azt feltételezi, hogy mindkét sejtpopuláció hozzájárul a pathogenesishez. A krónikus chlamydia infekciók meglehetősen gyakoriak [29], melyek

során a mediátorok folyamatos felszabadulása, elősegítve a gyulladásos sejtek beáramlását, károsíthatja a gazda epitheliumot, hegesedést és fibrosist provokálva [32].

Az *immunológiai paradigma* azon a feltevésen alapul, hogy a T-sejtes immunválasz, amely esszenciális a gazdaszervezet védelme szempontjából, mellékhatásként szöveti károsodást okozhat [32]. A mechanizmus azon alapul, hogy a specifikus antigénre a primer infekció során kialakult T-sejtes immunválasz a későbbi fertőzések alkalmával felerősödik, és fokozza a szöveti sérülést és a hegesedést [33]. Kezdetben a chlamydia Hsp60 került a kutatók látókörébe mint „kóros" antigén, mivel tengerimalac és majom kísérletekben a conjunctiva gyulladását okozta [34] [35]. A későbbiekben azonban bizonyítást nyert, hogy a gyulladást az inokulumban kontaminációként maradt Triton-X detergens okozta. Sőt, az újabb tengerimalac kísérletekben leírták a cHsp60 protektív szerepét [36], bár ennek ellentmond, hogy a humán tanulmányokban a súlyos betegek körében emelkedett cHsp60 ellenanyag szinteket mértek [37][38]. Egy nemrégiben végzett, prospektív vizsgálatban PID-ben szenvedő betegeket vizsgáltak, de nem találtak korrelációt a súlyos kimenetel és a magas cHsp60 specifikus ellenanyagszint között [34]. Mások szerint a cHsp60 stimulált perifériás T-sejtek IFN-γ termelése alkalmas a nők körében a protekció megjóslására [35]. Annak ellenére, hogy nem tisztázott, hogy melyik a chlamydia pathogén antigénje, amely a T-sejtes választ a krónikus és az ismételt fertőzések során generálja, ez a felfokozott T-sejtes válasz fokozhatja a betegség progresszióját.

A természetes *C. trachomatis* fertőzésre kialakult immunválasz nem komplett, valószínűleg a kórokozó számos, az immunrendszert elkerülő mechanizmusa miatt. Ezekhez a mechanizmusokhoz tartoznak a fő protektív antigénjeinek variációi és a gazdasejt által a chlamydia fertőzés következtében teremtett cytokin környezet, amely hozzájárul ahhoz, hogy a chlamydia perzisztens állapotba kerüljön, és csökkenjen a fő antigénjeinek a kifejeződése [39]. A chlamydia protease-like activity factor (CPAF) proteinje gátolja továbbá az MHC általi prezentációt [40]. Talán az egyik legfontosabb immunrendszert elkerülő mechanizmus, hogy a chlamydia replikációja a sejten belül egy védőburokban történik, elzárva az immunrendszer elől. Az ismeretek, melyek a *C. trachomatis* fertőzés ellen kialakuló immunmechanizmusok szerepét tárgyalják, főként egér modellekből származnak. A protektív immunitáshoz a T-sejtek, különösen az MHC-II korlátozott $CD4^+$ T-sejtek szükségesek [41]. MHC-I korlátozott $CD8^+$ T-sejtek egyes kutatók szerint viszont nem szükségesek a fertőzés legyőzéséhez vagy az újra fertőződés elleni immunitáshoz [42]. Az ellenanyagok védő szerepe kevésbé észrevehető, mint a celluláris válaszé, de nagyon fontosak a vakcinák fejlesztésében, és ugyanannyira protektívek a reinfekciók során, mint a $CD4^+$ sejtek [43]. Ezenfelül a T helper1 (Th1) cytokinek, különösen az IFN-γ és az interleukin-12 (IL-12) szerepe elengedhetetlen a protektív válasz kialakításában [44]. Nőkben az aktív fertőzés során $CD4^+$ T-sejtek vándorolnak a cervixbe. Különböző tanulmányokban, amelyekbe nőket vontak be, megerősítették, hogy a helyi Th1 cytokinek, különösen az IFN-γ hozható kapcsolatba a *C. trachomatis* fertőzéssel szemben kialakult immunitással [45].

A *C. trachomatis* proteinekre specifikus IgG és IgA ellenanyagok megtalálhatók a szérumban és a genitális mucosában az akut fertőzés során [46]. A *C. trachomatis*szal fertőzött egyénekben mérhető ellenanyagok mennyisége, beleértve az endocervix váladékban levőt is, viszont nem korrelál a protektív immunitással, csupán csak egy korábban lezajlott fertőzést jelez. Amikor a genitális *C. trachomatis* elleni vakcina fejlesztésének kérdése és igénye felmerül, számolni kell a genitális traktus egyedülálló jellemzőivel. Egyrészről a mucosális szövetek közül az egyetlen, amelyből hiányzik a szervezett nyirokérhálózat, amely egy késleltetett szisztémás választ eredményezhet, más anatómiai helyekhez viszonyítva [47]. Másrészről a női genitális szerv hormonális hatásnak kitett, így az intravaginális vakcináció hatásosságát erősen befolyásolja a menstruációs ciklus is [48]. A cervicitisben szenvedő anyáról a *C. trachomatis* átvihető az újszülöttre conjunctivitist vagy pneumoniát okozva.
A lymphogranuloma venereumot a *C. trachomatis* L1-L3 típusai okozzák. Korábban ezen megbetegedés szinte nem fordult elő a fejlett országokban, viszont Afrikában, Ázsiában, Dél-Amerikában és a Karibi-térségben endémiás volt. Az utóbbi évtizedekben először holland kutatók, majd világszerte beszámoltak a *C. trachomatis* L törzseinek felbukkanásáról a homoszexuális férfiak körében [49][50]. A betegség klinikai lefolyásának három fázisa van. Az első fázis az inkubációt követő 3-30 napig terjed, amelyet a kisméretű fájdalmatlan ulcerálódó fekély megjelenése jellemez. Ezt követően a lézió nyomtalanul meggyógyul, rendszerint anélkül, hogy a beteg észrevenné. A második szakaszban, mely az infekciót követően hetekkel vagy hónapokkal kezdődik, a regionális nyirokcsomó fájdalmas duzzanata, a lymphadenopathia alakul ki. A homoszexuális férfiak között anális ulcerációk és proctitis is kialakulhat. Ezen betegeknél gyakori tünet a fájdalom, a rektális vérzés és a láz. A harmadik stádiumban, kezelés hiányában a nyirokcsomók nekrotizálnak, a nyirokerek elzáródnak és ennek következtében elefántiázis alakul ki.

1.2. *C. muridarum*

A *C. muridarum* (korábban *C. trachomatis* mouse pneumonitis (MoPn)) egy egér pathogén, melyet eredetileg egér tüdőből izoláltak, és csak az utóbbi időkben szolgál a humán genitális fertőzések egér modelljéül [51]. A *C. muridarum* és a *C. trachomatis* D szerovariánsa meglepően nagy hasonlósággal rendelkeznek a géntartalom és -sorrend tekintetében, kivételt képez ez alól az 50 kb nagyságú plaszticitási zóna (PZ) [52]. A PZ-ban találhatók a cytotoxinok kódolásáért felelős gének és a triptofán operon. A *C. muridarum* és a *C. trachomatis* cytotoxin gének analízise alapján úgy gondolják, hogy ezek fontos virulencia faktorként szolgálhatnak [16]. 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-γ-val szemben [44][53].
A genetikai hasonlóságon túlmenően, a *C. muridarum* okozta genitális fertőzés utánozza a *C. trachomatis* fertőzés nőkben okozta kórképet. A *C. muridarum* intravaginális inokulációja a vaginális és a cervicális epithelsejtek önlimitáló fertőzését eredményezi, mely a későbbiek során a hámréteg felületén terjedve felszálló fertőzést okozhat az uterus szarvában, valamint

a petevezetőben [54]. A gyógyulás kb. 4 hetet vesz igénybe, és hosszú távú adaptív immunitást eredményez, mely többnyire védő hatású az ismételt fertőzésekkel szemben [51]. A hisztopatológiai vizsgálatok alapján a korai fertőzést a polimorfonukleáris sejtek uralják. Az akut fertőzés után ezen sejtek kicserélődnek macrophágokra, B-sejtekre $CD4^+$ és $CD8^+$ T-lymphocytákra. A $CD4^+$ T-sejtek jelen maradnak a fertőzések kései szakaszában, majd a fertőzés felszámolását követően is, sokszor kis aggregátumokat alkotva a genitális submucosában [55]. A gyógyulást követően az egerek 60 %-a rezisztenssé válik az ugyanazzal a törzzsel kiváltott reinfekcióval szemben. Azok az egerek is, amelyek érzékenyek maradnak a fertőzésre, sokkal hamarabb képesek felépülni, és a visszatenyészthető baktériumok száma is sokkal kevesebb bennük, mint a pimer fertőzés során [54]. Ahogy a humán fertőzésekben, az egerekben is megfigyelhető a fertőzést követő kései szövődmény, az infertilitás, ami megerősíti a *C. muridarum* szerepét a genitális fertőzések modellezésében [56]. Néhány egértörzs nagyobb hajlamot mutat a hydrosalpinx kialakulására, valamint nagyobb számban ürítik a kórokozót, de más tekintetben a fertőzés általában hasonló képet mutat. Ezzel ellentétben a *C. trachomatis* okozta fertőzés kimenetele 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 [56][57]. A CH3 egerek viszont lényegesen érzékenyebbek a *C. trachomatis* okozta fertőzésre. A fertőzést követően ezen egerekben a *C. trachomatis* 2-5 hétig lehet jelen [58]. Amennyiben az állatokat intravaginálisan fertőzik *C. trachomatis*szal, ritkán alakul ki kései szövődmény pl. hydrosalpinx. Ezen szövődmény kifejlődése akkor valószínű, ha az uterus szarvába vagy a petefészek burzába direkt inokulálással történik a fertőzés [59]. Erős adaptív immunválasz alakul ki *C. trachomatis* fertőzés során [32], de ezek a fertőzések az adaptív immunitás hiányában is meggyógyulnak [44], ami arra utal, hogy a természetes immunválasz egyedül is képes a fertőzés legyőzésére. 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 fertőzéses 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 [60]. Mivel a *C. trachomatis* fertőzés felszámolására az egerekben a természetes immunitás önmagában is képes [44], elengedhetetlen, hogy az összes vakcinálási tanulmány alkalmazzon a protektív természetes immunválasz kimutatására kontrollokat. A *C. trachomatis*szal ellentétben a *C. muridarum* okozta genitális fertőzés leküzdése, valamint a védelem kialakulása az ismételt fertőzésekkel szemben az egerekben teljes mértékben az adaptív immunválasztól függ. Ezért a *C. muridarum*

genitális fertőzéses modell alkalmasabbnak tűnik az adaptív immunválasz tanulmányozására a vakcina fejlesztések 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 [61]. A sejtek autonóm immunitása a gazdasejtek belső tulajdonsága, amely olyan védelmi mechanizmusokat indít, amelyek megakadályozzák az intracelluláris pathogének szaporodását. A védelemben szerepet játszó gének általában indukálhatók, a legfontosabb indukáló cytokin az IFN-γ. Korábban már leírták, hogy az emberi sejtekben az intracelluláris anti-chlamydiás védekező mechanizmus az IFN-γ által indukált indolamine-2,3 dioxygenase (IDO) expresszió, amely az intracelluláris triptofán készlet degradálódásához és végül a triptofán-auxotroph *C. trachomatis* halálához vezet [62]. Ez az eliminációs mechanizmus *in vitro* hatékony mind a humán *C. trachomatis*, mind a genetikailag közeli rokon egér chlamydia faj, a *C. muridarum* esetén [63]. Ezzel ellentétben az *in vitro* adatok azt mutatták, hogy az IDO nem indukálható chlamydia fertőzéssel és/vagy IFN-γ-val kezeléssel egér hámsejtekben [63]. Az IFN-γ-val kezelt és a chlamydiával fertőzött egér hámsejtek microarray elemzése rámutatott, hogy ehelyett az IFN-γ által indukálható gazdasejti GTPázok tehetők felelőssé emberi chlamydia törzsek fejlődési ciklusának megzavarásáért [53]. Az egér chlamydia törzs kifejlesztett olyan mechanizmus(oka)t, amelyek inaktiválják a GTPáz választ, és ezt az eliminációs mechanizmust hatástalanná teszik [53] [64]. Ennek ellenére a *C. muridarum* törzs gyorsan eliminálódik az egér cervicovaginális traktusából [53], így az egerekben még ismeretlen eliminációs mechanizmusok működnek, amelyek *in vivo* hatásosak az egér chlamydia törzsekkel szemben.

1.4. *C. pneumoniae*

1.4.1. A C. pneumoniae mikrobiológiai sajátosságai, fehérjéi

A szekvencia analízissel azonosított *C. pneumoniae* gének nagyon hasonlóak a *C. trachomatis* és a *C. psittaci* strukturális, funkcionális és immunológiailag fontos fehérjéket kódoló génjeihez. Ezek közül homológok az *ompA*, *ompB*, *groEL*, és *dnaK* gének. A különböző *C. pneumoniae* izolátumokban a MOMP kódoló gének azonosak [65][66][67]. Lényeges, hogy a *C. trachomatis* esetén a domináns MOMP a *C. pneumoniae* esetében nem immundomináns fehérje. A MOMP, ahogy a neve is mutatja, a külső membránban helyezkedik el, molekulasúlya 39.5 kDa. A *C. pneumoniae* MOMP ellen termelődött ellenanyagok keresztreagálhatnak más chlamydiákkal [68]. A külső membránban található még a 98 kDa molekulasúlyú protein, mely igen gazdag ciszteinben és a *C. pneumoniae*ra specifikus. Ez a fehérje adja a kórokozó rigiditását és körteszerű alakját. A 60 kDa-os OmpB ugyancsak gazdag ciszteinben, viszont konzervált protein, így minden chlamydiában azonos [69]. *A C. pneumoniae* esetében leírtak

két Hsp-t kódoló gént [70][71], melyek *groEL* (60 kDa) és *dnaK* (70 kDa) homológok, és a *C. trachomatis* esetén kapcsolatba hozhatók immunpathológiás és immunprotektív folyamatokkal egyaránt [72][73]. A *C. pneumoniae* Hsp60 és Hsp70 proteinjét is felismeri a *C. pneumoniae* fertőzött betegek széruma mikroimmunfluoreszcens (MIF) tesztben [74].

A *Salmonella*, a *Shigella* genusok, a *Pseudomonas aeruginosa*, a pathogén *Escherichia coli* mellett a *C. pneumoniae* is rendelkezik egy TTSS rendszerrel, mely segítségével a baktérium különböző effektor proteineket szekretálhat a fertőzött sejt citoplazmájába [75][76]. Ez a rendszer aktív a chlamydia intracelluláris szaporodási ciklusa alatt, és felelős egyrészt a chlamydia proteinek inklúziós membránon keresztüli transzportjáért, másrészről pedig a chlamydia proteinek citoplazmába szekretálásáért, amelyek később megváltoztatják a sejt működését a fertőzés során. Az *lcrE* gén által kódolt protein homológ a *Yersinia* YopN felszíni fehérjéjével [77], melyről úgy gondolják, hogy a TTSS regulátora, mely érzékeli a sejtkontaktust *in vivo*, *in vitro* pedig a Ca^{2+} koncentrációt [20]. Az LcrE fehérje jelenléte kimutatható az EB-kben, ez azt sugallja, hogy a TTSS apparátus teljesen összeszerelődött az extracelluláris chlamydiákban, és valószínűleg szerepet játszhat a fertőzés korai szakaszában, segíthet a chlamydia gazdasejtbe juttatásában és a korai inklúziós vakuola létrehozásában [78]. Herrmann és mtsai [79] az *lcrE* megemelkedett expressziójáról számoltak be a *C. pneumoniae* fertőzés kései szakaszában. Az a tény, hogy az LcrE jelen van a chlamydia felszínén, elérhető állapotban az immunrendszer és az ellenanyagok számára, lehetséges vakcina alegység jelöltté emeli ezt a proteint. Az *lcrH* által kódolt LcrH protein a TTSS rendszer tagja és mint dajkafehérje működik. Az LcrH csak a chlamydia fejlődési ciklusának a kései szakaszában fejeződik ki [80].

1.4.2. A C. pneumoniae által okozott megbetegedések

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. Ez utóbbi főképpen az idősebbeket érinti, és azokat a betegeket, akiknél cardiopulmonális megbetegedés is fennáll [81]. A CAP esetek 30%-ában a *C. pneumoniae* valamely más baktériummal együtt fordul elő a mintákban [82].

A *C. pneumoniae* okozta fertőzés pathomechanizmusa még nem teljesen tisztázott. Korábbi tanulmányaink alapján a fertőzést követő 7. napon mutatható ki a *C. pneumoniae* a legnagyobb mennyiségben a fertőzött egerek tüdejéből. A visszatenyészthető *C. pneumoniae* mennyiséggel párhuzamosan változott az IFN-γ szintje, mely a baktérium eliminálásában rendkívül fontos szerepet játszik [83]. A *C. pneumoniae* az akut fertőzés mellett képes perzisztens fertőzés létrehozására [84]. A nem respiratorikus traktusban kialakult *C.*

pneumoniae okozta perzisztens/krónikus fertőzés arra utal, hogy a kórokozó bekerül a véráramba. A *C. pneumoniae* DNS-ét ennek megfelelően kimutatták atherosclerotic plakkokból és a vér perifériás mononukleáris sejtjeiből (PBMC) [85][86]. A *C. pneumoniae* DNS-nek a gyakorisága és az időbeli változása a vérben primer és az újrafertőzések során nem ismert. A hisztidin dekarboxiláz (HDC) enzim szerepét, mely egyedül képes a hisztamin előállítására, már korábban vizsgáltuk primer *C. pneumoniae* fertőzést követően [83]. Korábbi kísérletünkben a HDC enzim kifejeződése korrelált az IL-6 szinttel egyszeri *C. pneumoniae* fertőzést követően egerekben [83]. Tanulmányok szerint a *C. pneumoniae* okozta fertőzésekre kezdetben a tüdő neutrophil sejtes beszűrődése, majd a lymphocyta infiltráció jellemző [87]. Az azonban kevésbé tudott, hogy mi indukálja a neutrophil granulocyták és a lymphocyták beáramlását a tüdőbe. A pathogének szerepét az asthmás megbetegedések fellángolásában már régen gyanították. A *C. pneumoniae* és az asthma kapcsolatát Hahn és munkacsoportja vetette fel az 1990-es években [88]. Az atípusos pathogének által okozott fertőzés és az asthma fellángolása közötti összefüggést kutatták gyermekekben [89]. A tanulmányok többsége arra jutott, hogy a bakteriális fertőzéseknek szerepe van az asthmás roham kiváltásában. A *C. pneumoniae*t az asthmás epizódok 4.5%-25%-ában lehetett kimutatni [89]. Az akut atípusos fertőzéseket tanulmányozták felnőttekben is asthmás fellángolások során, az előbbiekhez hasonló eredményt kaptak [90]. Egy tanulmány szerint az asthma kiújulása és az akut *C. pneumoniae* fertőzés jelenléte súlyos légzésfunkció csökkenést eredményezett. A vizsgált betegcsoportban az erőltetett kilégzési másodperc-térfogat (FEV1) is kisebb volt olyan betegekkel összehasonlítva, akiknél akut fertőzés nem volt jelen [91]. Az asthma mellett a légúti pathogéneknek szerepe lehet a krónikus obstruktív betegségek (COPD) fenntartásában is. A *C. pneumoniae* általában megtalálható krónikus bronchitisben, és szerepet játszhat a betegség progressziójában, mivel toxikus az epithelsejtekre, rontja a ciliáris funkciót és fokozza a krónikus gyulladást proinflammatorikus cytokinek termelésével [92][93]. Szerológiai módszerekkel, elektronmikroszkóppal és immunhisztokémiai eljárással bizonyították a *C. pneumoniae* kolonizációt COPD-ben szenvedő betegekben [94][95]. Krónikus *C. pneumoniae* kolonizáció szignifikánsan súlyosabb funkcionális károsodással jár COPD során, és a betegnek nagyobb esélye van akut exacerbációra is [96]. Figyelembe véve azt, hogy a *C. pneumoniae* fertőzés nagyon gyakori, valamiféle egyéni faktor szükséges, ami hajlamossá teszi az egyént az asthmás fenotípusra [97]. Egy korábban végzett állatkísérletben az egereket *C. pneumoniae*val inokulálták, a fertőzés tartós légúti túlérzékenységet és gyulladást váltott ki az állatokban [98].

Az első tanulmány még 1988-ban jelent meg, melyben beszámoltak a *C. pneumoniae* atherosclerosisban betöltött esetleges szerepéről [99]. Ezt az összefüggést alátámasztották szeroepidemiológiai, immunhisztokémiai, PCR és elektronmikroszkópos vizsgálatok, valamint a pathogén kitenyésztése a koszorúerekből [100][101][102][103][104]. Szignifikánsan emelkedett humán Hsp60 és *C. pneumoniae* ellenanyagszintet találtunk mi is korábbi munkáinkban a coronária betegségben (CAD) szenvedőkben. Logisztikus regressziós analízissel kimutattuk, hogy ezen összefüggések függetlenek a kortól, a nemtől, a

dohányzástól, valamint a szérum lipidszintektől. Azokban a személyekben, akikben magas hHsp60 illetve *C. pneumoniae* ellenanyagszintet mértünk, a betegség kialakulásának a kockázata jelentősen emelkedett (esélyhányados 82.0) (95% CI 10.6-625.0) [100]. Logisztikus regressziós analízissel kimutattuk, hogy a coronária betegség kockázata fokozott a *C. pneumoniae* pozitív és a mannose binding lectin (MBL) variáns alléljait hordozó betegekben [101]. Korábbi állatkísérleteink során normokoleszterinémiás BALB/c egerekben *murin cytomegalovirus* (MCMV) fertőzést követően időlegesen gyulladásos fókuszok alakultak ki az egerek aortaívében. A gyulladásos gócok egy része később előrehaladott lézióvá fejlődött. Az MCMV által indukált korai elváltozásokat az aortaívben szignifikánsan súlyosbította az egerek későbbi *C. pneumoniae* fertőzése [105]. A CMV-vel fertőzött sejtek felülúszója fokozta a monocyta eredetű dendritikus sejtek érését, funkcionális aktivitását [106]. Egérmodellben mások és mi is vizsgáltuk a *C. pneumoniae* atherosclerosis kiváltásában és progressziójában betöltött szerepét [105][107]. 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. A leggyakrabban használtak az ApoE hiányos ($ApoE^{-/-}$), az LDL receptor hiányos ($LDLR^{-/-}$) és humán apoB100 transzgenikus egerek, amelyek kifejezett atherogenesist mutatnak, különösen, ha atherogén étrenddel táplálják az állatokat [108]. $ApoE^{-/-}$egerekben az atherosclerosis spontán módon alakul ki. Ezekben az 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 [109] [110]. Az ApoB100only(ApoB 100/100)/$LDLR^{-/-}$) egér törzs egy mutáns apoB gént hordoz, mely gátolja az apoB48, az ApoB csonka formájának az expresszióját, utánozva a humán viszonyokat [109] [111]. Az LDLR hiány megakadályozza az apoB100-tartalmú LDL felvételét a szövetekben, ami magas plazma-szintű apoB100-tartalmú koleszterinben gazdag LDL-t eredményez. Az ezen egér törzs megalkotói ezeket az egereket az emberi familiáris hiperkoleszterinémia hiteles, legmegfelelőbb modelljének tartják [109]. Az ApoB100only/$LDLR^{-/-}$ egereket eddig még nem használták modellként a *C. pneumoniae* fertőzés az atherosclerosis progressziójára gyakorolt hatásainak vizsgálatában. A *C. pneumoniae* DNS és antigén gyakran kimutatható az atheroscleroticus plakkok celluláris komponenseiből, így pl. a dendritikus sejtekből (DC), ezzel szemben az egészséges érszakaszokban ritkán vagy egyáltalán nem található meg [112]. A *C. pneumoniae* kimutatható az óriássejtes arteritises betegek artéria temporalis biopsziáiból [113], valamint jelen van az egészséges és cardiovasculáris betegek perifériás mononukleáris sejtjeiben is [114]. Tisztázatlan az a kérdés, hogy melyik sejt végzi a kórokozó transzportját a fertőzés helyétől az erek atherosclerotikus szakaszaiba. A természetes immunitás sejtjeinek tekintett DC-k az elsődleges szereplők, melyek részt vesznek a pathogének feldolgozásában és

bemutatásában, megindítva ezzel az adaptív immunválasz lépéseit. Mielőtt a DC aktiválná a T-sejteket, maga is egy érési folyamaton megy keresztül, melyet maga a pathogén vagy más immunsejt vált ki [115]. Ugyanakkor a DC-k alkalmasak látens vírusok hordozására valamint bizonyos baktériumok pl. a *C. pneumoniae* internalizációjára is [113][112]. A monocyták, a monocyta-eredetű DC-ék és a macrophágok kölcsönhatása a *C. pneumoniae*val kevéssé ismeretes.

1.5. Az IL-17 cytokinek szerepe légúti fertőzésekben

A bakteriális pneumonia elleni védekezésben jelentős szerepe van a bronchus-asszociált lymphoid szövetként (BALT) ismert másodlagos nyirokszövetnek. A BALT megfelelő környezetet biztosít ahhoz, hogy az antigéneket az antigént bemutató sejtek, a neutrophil granulocyták és a macrophágok specifikus mintázat felismerő receptoraik segítségével felismerjék, és a kórokozókat phagocytosis révén eliminálják, továbbá az antigén bemutatásával indukálják a specifikus immunválaszt az érett T- és B-lymphocyták aktiválásával. A neutrophil granulocyták tüdőbe irányuló beáramlását számos cytokin és chemokin biztosítja. A jelenlegi ismeretek alapján ebben a legfontosabb szerepet az IL-23/IL-17 tengely játszik. Peng Ye és mtsai. az extracellulárisan szaporodó *Klebsiella pneumoniae (K. pneumoniae)* okozta tüdőgyulladás esetén vizsgálták az IL-17A szerepét. A kísérlet során az egerek egyik csoportját az IL-17A génjét tartalmazó rekombináns adenovírussal (AdIL-17A) kezelték intratracheálisan a fertőzést megelőzően, míg a másik csoportot a vad típusú vírussal. A fertőzést követően különböző időpontokban mérték az egerek szérumának és a BAL MIP-2, TNF-α, G-CSF tartalmát és a neutrophil granulocyták számát, valamint az egerek egy elkülönített csoportjában figyelték az egerek túlélését. A kutatócsoport arra az eredményre jutott, hogy a kívülről bevitt IL-17A megnövelte a tracheában a MIP-2, TNF-α és a G-CSF szintet. Az AdIL-17A-val kezelt egerek BAL folyadékából több granulocytát tudtak izolálni, és ezzel egy időben kevesebb *K. pneumoniae*t tudtak visszatenyészteni a tüdejükből a kontrollként használt egerek mintáihoz képest. Ráadásul a *K. pneumoniae* fertőzést követően az AdIL-17A-val előkezelt állatok túlélési esélye is megnőtt a kontrollhoz képest [116].

Umemura és mtsai az IL-17A szerepét tanulmányozták az intracelluláris pathogén, a *Mycobacterium bovis (M. bovis)* okozta tüdőgyulladás esetében. A fertőzés korai szakaszában az egerek tüdejében magas IL-17A és IL-23 szintet mértek, a fertőzetlen egerek mintáihoz képest. IL-17A génkiütött egerekben a BCG fertőzést követően jelentősen csökkent a MIP-2, a KC, a G-CSF és az IL-6 szintje a betegség akut szakaszában. Az IL-17A főbb forrásának nem a $CD4^+$ Th17 sejtek bizonyultak, hanem a $CD4^-$, $CD8^-$, $CD3^+$, γδ T-sejtek. A fertőzés kései szakaszában a génkiütött egerek esetében a granulomák száma és mérete is csökkent a kontrollhoz képest; ez arra utal, hogy a *M. bovis* fertőzés során az IL-17A nemcsak a betegség akut szakaszában játszik jelentős szerepet a kórokozó legyőzésében, hanem a krónikus periódusban is [117]. Az IL-17A mRNS expresszió megemelkedett a különböző légúti megbetegedésekben, ahol neutrophil sejtek jelen vannak, így a súlyos asthmában, krónikus obstruktív tüdőbetegségben, cisztás fibrózisban [118]. Az IL-17A légúton keresztül történő

bejuttatása szignifikáns módon növelte a neutrophil sejtek számát és ehhez kapcsolódóan emelte a KC, MIP-2 és a LIX expresszióját. LPS-közvetítette légúti gyulladásos modellben az IL-17A neutralizálása szignifikánsan csökkentette a neutrophil sejtek számát [119]. Ezek az adatok rámutattak az IL-17A fontos szerepére a légúti gyulladásos válasz és a neutrophil sejtek vándorlásának szabályozásában.

Az IL-17E vagy másképpen IL-25 a Th2 mediálta immunválaszban játszik szerepet [120]. Az IL-17E az IL17RB receptorhoz kötődik, a receptor transzkriptuma nagy mennyiségben fejeződik ki a máj, a vese, és kisebb mennyiségben az agy, a here és a vékonybelek sejtjeiben [197]. Az IL-17E hiányos egerek csökkent mértékű Th2-cytokin termelést mutatnak, így kevésbé rezisztensek a *Trichuris* fertőzésre [122]. Ezzel ellentétesen, az IL-17E túltermelődése vagy rekombináns IL-17E adagolása erőteljes Th2-es cytokin expressziót és IgE ellenanyag termelődést váltott ki *in vivo* pathológiás allergiás állapotokban [123]. Az IL-17 családba tartozó különböző cytokinek termelődésének kinetikáját korábban még nem vizsgálták egér modellben *C. pneumoniae* fertőzést követően. Zhou és munkatársai beszámoltak arról, hogy az IL-17A-nak fontos szerepe van a gazdaszervezet érzékenységének a szabályozásában *C. muridarum* fertőzés során egerekben, valamint a megváltozott IL-17/Th17 profil magasabb alapszintű IL-17RC kifejeződésre hajlamosított a C3H/HeN egerek tüdejében [124]. Az IL-17A-nak, mint a neutrophil granulocyták legjelentősebb aktivátorának meghatározó szerepe van a szervezet védekező rendszerében. Nemcsak bakteriális fertőzésekkel szemben van protektív hatása, szerepét kimutatták *Cryptococcus neoformans* [125] és *Candida albicans* [126] okozta fertőzésekben is. Az IL-17A-ra vonatkozó vizsgálatok nagy része állat modelleken történt, de az emberi szervezetben betöltött szerepét is tanulmányozták, és hasonló eredményekre jutottak [127].

1.6. Chlamydia okozta fertőzések megelőzésének lehetőségei

1.6.1. A chlamydia vakcinák hőskora

Bár a chlamydia vakcina kutatásnak a hosszú története van, az utolsó humán vakcina kísérletet csaknem 50 éve végezték [128]. A chlamydia elleni vakcináció kezdeti megközelítése teljes mértékben az empirikus, Pasteur által lefektetett elven alapult: ”attenuálni vagy inaktiválni és beadni”. Először attenuált vakcinákkal próbálkoztak. Az előállításukra a chlamydiát sorozatosan sejtkultúrán 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 [129]. A hátrányukként róható fel, hogy a vakcinációt követően az élő szervezetben visszamutálódhatnak az eredeti, virulens törzzsé, mely fertőzést vagy akár perzisztenciát is kialakíthat [130], ezt követően pedig ez a törzs cirkulálhat a népesség körében [131]. További hibája, hogy olyan antigéneket tartalmaz, amelyek a természetes fertőzés lefolyását súlyosbíthatják. Az előállításuk nagy mennyiségben problematikus, az ilyen típusú vakcina hidegláncot igényel, ami pl. Afrikában meglehetősen nagy gond. Tekintettel a biztonsági

szempontokra és az immunpathológiai károsodás kockázatára, valószínűtlennek tűnik, hogy egy élő, legyengített *C. trachomatis* oltóanyag megengedett lesz humán használatra.
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. Röviddel azután, hogy Kínában sikerült tojásban izolálni a *C. trachomatis*t, 1959-ben, kémiailag inaktiválták és különböző adjuvánsokkal parenterálisan vakcinálást végeztek emberekben. A legjelentősebb eredménnyel végződött tanulmányok szerint is a gyermekek 70%-a vált védetté, de az immunitás hamarosan gyengülni kezdett, és nem tartott tovább a vakcinációt követő három évnél [132]. A vakcina formulálását behatóbban főemlősökön vizsgálták. Amikor a vakcinált főemlősöket heterológ törzzsel fertőzték, a gyulladásos pathológiai kép súlyosbodott. A kutatók úgy gondolták, hogy a protektív immunitást a törzsspecifikus antigének indukálták, az immunpathológiás folyamatot indukáló antigének viszont azonosak a törzsek között [132].

1.6.2. A chlamydia vakcinák újabb nemzedéke

A teljes organizmust tartalmazó vakcinák mellékhatásainak elkerülésére alegység vakcina kifejlesztése vált szükségessé. Az alegység vakcinák biztonságosak, nem tartalmaznak élő pathogént, mely visszaalakulhatna virulenssé, és nem tartalmaznak olyan antigéneket, amelyek fokoznák az immunpathológiai folyamatokat és a gyulladást [133]. Az alegység vakcinák tartalmazhatnak tisztított, rekombináns vagy szintetizált fehérjét. Természetesen az alegység vakcináknak is vannak hátrányai, hasonlóan az inaktivált vakcinákhoz, kevéssé indukálják a celluláris immunválaszt, ami a chlamydia esetében, lévén intracelluláris pathogén, igen fontos lenne, továbbá adjuvánst igényelnek a hatásuk kialakításához.
Tisztított fehérjéket tartalmazó vakcinák: A felfedezését követő húsz évben a chlamydia MOMP protein került szinte kizárólagosan a fókuszba, mint chlamydia alegység vakcina jelölt [6]. A MOMP azonban egy integráns membránfehérje és köztudottan nehéz preparálni natív konformációban. A denaturált rekombináns MOMP viszont mint vakcina csődöt mondott többféle állatmodellben [128]. A MOMP fehérje tisztítása szelektív detergensekkel és oszlopokon natív, trimer struktúrát eredményezett, amely kitűnő védelmet produkált egerekben, de csak részleges védelmet a nem humán főemlősökben [134].
Rekombináns fehérjéket tartalmazó vakcinák: Manapság a rekombináns DNS technika segítségével olcsón és költséghatékony módon lehet nagy mennyiségben bakteriális fehérjéket előállítani. A géneket, melyek az antigéneket kódolják, expresszálhatják prokarióta vagy eukarióta sejtek. A rekombináns MOMP-ot (rMOMP) általánosan használják chlamydia vakcinációs kísérletekben. A teljes hosszúságú rMOMP kifejeződése prokarióta expressziós rendszerben azonban toxikus hatással bír, továbbá meglehetősen nehéz olyan rMOMP-ot

előállítani, amely megőrzi az eredeti konformációs epitópjait, ezen kívül a MOMP protein még glikozilált is [135].

Különböző módokon próbálkoztak rMOMP vakcinával a chlamydia fertőzések megelőzésére. Az rMOMP fehérjét cholera toxinnal és CpG oligodeoxynucleotidokkal transcutan immunizálva egereket, specifikus IgG és IgA választ kaptak a hüvely és a cervix váladékban, valamint IgG választ a szérumban [136]. Pal és mtsai leírták, hogy *C. muridarum* rMOMP proteint a *Borrelia burgdorferi* külső membrán proteinjével (OspA) mint adjuvánssal együtt adva szignifikáns protekciót alakított ki az egerekben a genitális *C. muridarum* fertőzés ellen [137]. Sun és csoportja összehasonlította az rMOMP és a natív MOMP fehérjét tartalmazó vakcinákat [138]. Bár a *C. muridarum* rMOMP védő hatású immunválaszt indukált az intranasális fertőzéssel szemben, a kialakult válasz nem volt olyan kifejezett, mint a natív MOMP vakcinálás során. Ez a tény megint csak rávilágított a konformációs epitópok fontosságára. A rekombináns vakcinák hatékonysága nemcsak a beadandó fehérjéktől, hanem a bejuttatás módjától is függ. Bizonyítást nyert, hogy a kombinált vakcinálás, jelen esetben a szisztémás és mucosális, nagyobb védelmet biztosít a fertőzés során, mint a vagy csak szisztémás vagy a genitális immunizálás [139]. Bár a legtöbb rekombináns vakcina alapját a MOMP képezi, más proteinek is lehetnek vakcina alegység jelöltek. Murthy és csoportja egy újfajta vakcinálási módot dolgozott ki. A chlamydia rekombináns CPAF proteinjét adták IL-12 kíséretében intranasálisan BALB/c egereknek. A rCPAF+IL-12-vakcinált egerek szignifikánsan kevesebb chlamydiát ürítettek a chlamydia fertőzést követően és gyorsabban felépültek a mock immunizált kontroll egerekhez képest [140].

Szintetikus fehérjék, mint vakcinák: Napjainkban elérhetőek olyan számítógépes programok, melyek segítenek megjósolni egy adott antigén doménjeit és epitópjait. Ezen epitópok szintetikus előállítása olyan peptidek előállítását jelenti, melyek megegyeznek az adott antigén immunogén doménjével. Számolni kell azzal is, hogy az antigén determinánsok is lehetnek konformációs, háromdimenziós struktúrák, akár a normál proteinek, és ebben a formában képesek az immunválasz kiváltására. A MOMP peptidekkel és oligopeptidekkel végzett kísérletek eléggé különböző eredményeket mutatnak, de a legsikeresebb kísérletekben is csak részleges védelem kialakítására voltak alkalmasak [141][142].

1.6.3. A chlamydia vakcinák legújabb nemzedéke

A DNS vakcinálás az immunizálás egy viszonylagosan új típusa. A plazmid hordozza az adott antigén nukleinsavát és a gazdaszervezetbe bejuttatva, maga a gazdaszervezet a sejten belül megalkotja az antigént, amelyre aztán immunválasszal reagál. A DNS vakcina kiemelkedő tulajdonsága az inaktivált és alegység vakcinákkal szemben, hogy az antigének a sejten belül keletkeznek, és így endogén úton az MHC-I segítségével kerülnek prezentációra a cytotoxikus T-lymphocyták felé. Tehát a DNS vakcinára kialakult immunválasz Th1 irányba tolódik el, ahogy azt korábbi egérkísérletünkben mi is bizonyítottuk [143]. Emellett viszont számolni kell a DNS vakcina esetleges hátrányaival is. Nincs rá kísérletes bizonyíték, de elméletileg integrálódhat a gazdasejt genomjába, bár kutatók szerint erre az esély elenyészően kicsi [144]. A másik

hátránya, hogy a DNS immunizálást követően kialakuló ellenanyagok autoimmun folyamatokat indíthatnak el azáltal, hogy keresztreagálnak a gazda DNS-ével. További probléma, hogy az izomsejtek által hosszú ideig prezentált antigén ellen kialakult immunválasz befolyásolhatja a későbbi más típusú DNS vakcinálások sikerességét. Az is gondot jelent, hogy a transzfekció és az antigén kifejeződésének hatásfoka nem túl jó, különösen a nagyobb testű állatokban és emberben [145]. Végül, de nem utolsó sorban a DNS vakcina hátránya, hogy nem alkalmazható, ha az antigén nem fehérje természetű, vagyis szénhidrát, illetve lipid [146]. Számos hátrány ellenére az utóbbi időkben nagy számban láttak napvilágot olyan tanulmányok, melyekben különböző chlamydia antigének kódolásáért felelős géneket tartalmazó DNS vakcinákról és hatásukról számolnak be. A MOMP DNS vakcinával végzett kísérletek nagy csalódást okoztak, mert a MOMP önmagában alkalmazva csak minimális immunválaszt, protekciót pedig egyáltalán nem váltott ki egerekben [147]. A MOMP protein mellett próbálkoztak az *ompA* valamint a *pgp3* DNS vakcinákkal is. A *pgp3* DNS vakcina meggátolta a *C. trachomatis* terjedését az alsó genitáliákból a felső genitális régióba [148].
A korábbi chlamydia vakcinációs kísérletek eredményeit és hátrányait szem előtt tartva úgy döntöttünk, hogy kísérleteink során rekombináns úton előállított chlamydia proteinek hatását tanulmányozzuk egér modellben. Először megvizsgálva az Alum (alumínium-hidroxid) adjuváns hatását, mivel napjainkban még mindig ez a leginkább használt adjuváns a különböző vakcinákban, hatását összevetve az állatkísérletekben használt, igen jó immunválaszt kiváltó komplett Freund adjuvánséval.

1.7. A chlamydiák plazmidja

A legtöbb mikrobiológiai rendszerben az autonóm módon replikálódó plazmidok a genetikai variációk eszközeiként szolgálnak. A plazmidok gyakran horizontális módon átvihetők, ami a gyors terjedésükhöz vagy a különböző törzsek közötti fenotípus reasszociációhoz vezetnek [149]. Az antibiotikum rezisztencia terjedését gyakran plazmidok okozzák. Az ilyen plazmidtranszfer növekvő problémát jelent a fertőző betegségekben világszerte. Sok súlyos betegség a plazmid által hordozott virulencia faktor eredménye, és a plazmid szerkezeti variációi gyakran különböző szindrómákat okozhatnak annak ellenére, hogy a törzsek máskülönben közel állóak egymáshoz. Ez a fajta variabilitás nem jellemző a chlamydia plazmidjára. Sok chlamydia törzs hordoz egy homológ, 7500 bázispár nagyságú plazmidot, melynek a kópiaszáma kromoszómánként négy [150][151]. Gyakorlatilag az összes klinikai *C. trachomatis* izolátumban jelen van a plazmid. Nagyon ritkán számolnak be plazmidmentes chlamydiáról, így meglehetősen keveset tudunk ezen ritka izolátumok epidemiológiájáról [152][153]. A chlamydia plazmidja nem konjugálódik és nem integrálódik (egyetlen kivétel a *C. suis*, melyben a plazmid integrálódott), nem kódol antibiotikum rezisztenciát, és nem mutatja jelét a genetikai flexibilitásnak [154].
A nukleotid szekvencia azonosság a plazmidokban – melyek különböző chlamydia speciesektől származnak – 69 és 99% között mozog, a legnagyobb hasonlóság a *C. trachomatis* törzsekben levő plazmidok között van. A szekvenciák összehasonlítása azt sugallja, hogy a plazmidok

párhuzamosan fejlődtek a különböző chlamydia speciesekben [150][155]. A *C. trachomatis* plazmid 5 nyitott leolvasási keretet (ORF) hordoz. A humán *C. pneumoniae*nak nincs plazmidja, viszont a ló *C. pneumoniae*nak valamint más állatpathogén chlamydiáknak igen. A *C. muridarum* plazmid 7 ORF-et hordoz, melyet TCA01-TCA07-tel jelölnek. A TCA04 felelős a pGP3, a TCA05 pedig a pGP4 plazmid protein kódolásáért [52]. A chlamydia plazmid gyakorlati jelentősége, hogy a nukleinsav amplifikációs tesztek (NAAT) targetjéül szolgál, így szerepe fontos a humán diagnosztikában [156]. NAAT alapú módszerek nagyon értékesek a chlamydia okozta betegségek kontrolljában. Problémát jelenthet azonban ritkán az, ha a target szekvencia, amelyet az adott diagnosztikai kit céloz, deletálódott, ez pedig álnegatív eredményhez vezethet [157]. A chlamydia plazmid kritikus az *in vivo* szaporodáshoz, viszont nem szükséges *in vitro* körülmények között. Több laboratórium is beszámolt fenotípusos változásról, amely a plazmidmentességgel hozható kapcsolatba. Matsumoto sikerrel alkalmazott egy plakk tisztítási módszert, melynek eredményeként plazmidmentes chlamydiát nyert, és megfigyelte, hogy ezek a klónok nem halmoztak fel glikogént a chlamydia inklúzióban. Később kiderült, hogy az összes glikogén negatív törzs egyben plazmidmentes is [158]. További tanulmányok is megerősítették a glikogén hiányát, és vizsgálták a teljes chlamydia genom transzkripcióját a vad típusú törzshöz hasonlítva [159][160]. Bár a plazmid-kromoszóma kereszt-szabályozásának pontos köre még nem teljesen ismert, a chlamydia gének expresszióját a plazmid gének hiánya negatívan befolyásolja. A *C. trachomatis* gének közül az egyik, amely alulszabályozott a plazmidmentes törzsekben, a *glgA*, a glikogén bioszintetikus gén. Azt feltételezik, hogy a plazmid által kódolt elemek szabályozzák, és talán közvetlenül részt is vesznek a chlamydia inklúzion belül a glikogén akkumuláció folyamatában. Egy későbbi kísérlet alapján, melyben plazmidhiányos chlamydiával dolgoztak, arra a következtetésre jutottak, hogy a plazmid fontos virulencia faktor, jelentős hatással van a klinikai betegség lefolyására egér modellben. Bár a plazmidhiányos chlamydiák hasonló ütemben szaporodnak, mint az izogenikus vad típusú törzsek, képtelenek aktiválni a TLR-2 dependens immunválaszt *in vivo* és *in vitro* [161]. Más munkák arra mutatnak rá, hogy a plazmidhiányos *C. trachomatis* törzseknek szignifikánsan magasabb az 50%-os fertőző dózisuk a vad típusú törzsekhez viszonyítva [160].

Mivel szinte minden *C. trachomatis* hordozza ezt az igen konzervatív plazmidot, kutatók egy része arra a megállapításra jutott, hogy a plazmidnak fontos szerepe van a chlamydia fertőzések során. Már a korai tanulmányokban leírták, hogy a chlamydia fertőzött egyének ellenanyagokat termelnek a pGP3 fehérje ellen, melyet a plazmid ORF5 kódol. Ezek az ellenanyagok szisztémásan a keringésben, valamint mucosálisan is jelen vannak [162]. A kísérletek azt mutatták, hogy a natív pGP3 trimer molekula formában transzportálódik a gazdasejt citoplazmájába a fertőzés során [163]. Az a tény, hogy a *C. trachomatis* fertőzésen átesett betegekben kimutatható a pGP3 specifikus ellenanyag, azt sugallta, hogy a pGP3 egy jó antigén, ennek megfelelően megvizsgálták a pGP3 proteint, mint esetleges vakcina jelöltet. A DNS vakcina formában bejuttatott *pgp3* ellen kialakult immunitás megakadályozta a fertőzés során a kórokozó terjedését a felső genitális régióba [148]. A chlamydia plazmid által

kódolt többi fehérjének a szerepe még kevésbé ismert. Az utóbbi időben jelent meg egy közlemény, melyben beszámoltak arról, hogy a pGP4 protein a *pgp3* génnek valamint más kromoszómális géneknek a transzkripcionális regulátora [164].

1.8. A chlamydia fertőzések kezelése

A chlamydia fertőzés kezelése nem egyszerű. Mivel intracelluláris pathogénről van szó, olyan antibiotikumot kell alkalmazni, amely az intracelluláris térben dúsul fel. Amiatt, hogy sok esetben nincsenek is tünetek, vagy nem jellegzetesek, sokszor a terápiát már csak akkor kezdik el, mikor a komplikációk gyógyításáról kell gondoskodni.

A közösségben szerzett pneumoniáknál általában empirikus alapon indítják meg a kezelést, ami nem minden esetben hatékony, ha a kórokozó a chlamydia. Ennek oka, hogy a klasszikus bakteriális pneumonia klinikai képe nem különíthető el egyértelműen az intracelluláris mikroorganizmus által kiváltott tüdőgyulladástól, a β-laktámok pedig nem hatnak az utóbbiakra. A nem megfelelő terápia eredményeképp a tünetek súlyosbodhatnak, ami a beteg életét is veszélyeztetheti. A hatékonyság nagymértékben függ attól is, hogy a páciensek mennyire tartják be a gyógyszerszedési utasításokat. Szexuális úton szerzett megbetegedésnél nem elég a panasszal rendelkező felet kezelni, hanem a partner terápiájáról is gondoskodni kell. Az antibiotikum kezelés ellenére a fertőzés perzisztálhat, látens infekció jöhet létre, tehát a kezelés nem minden esetben jelent végleges megoldást. *C. trachomatis*szal fertőzött nőknél a kezelés ellenére az esetek 10-15%-ában visszatérő vagy perzisztens fertőzés formájában továbbra is számolni kell a chlamydia hosszú távú hatásaival. Korábbi kísérletek alapján felmerült annak lehetősége, hogy egyes antibiotikumokkal szemben, például makrolid terápia során rezisztencia alakulhat ki. Más tanulmányok inkább azt feltételezik, hogy ezek mögött az eredmények mögött inkább a terápia alkalmazásában történt hiba áll. Ezzel ellentétben *in vitro* vizsgálatok során genetikailag módosult fluorokinolon és rifampin rezisztens *C. trachomatis*t is leírtak [165].

A β-laktám antibiotikumok a peptidoglycan szintézist gátolják meg azáltal, hogy a penicillin-kötő fehérjékhez kapcsolódnak. A chlamydiák rendelkeznek ugyan penicillin-kötő fehérjékkel, de a peptidoglycan vázát eddig nem detektálták, annak ellenére, hogy a muraminsavból felépülő peptidoglycan váz szintéziséhez szükséges gének megtalálhatóak a chlamydia genomjában [166]. Penicillin hatására nagyobb méretű, aberráns alakok jönnek létre, melyeknek egy része képes visszatérni a fejlődési ciklusba a penicillin elhagyása után. A fertőzés kezdetén adott penicillin nem gátolja meg sem a gazdasejthez kötődést, sem az RB-vé differenciálódást [167]. Húsz órával a fertőzés után adott penicillin hatására ugyan a bináris hasadás megáll, nem alakul vissza az RB EB-vé, nem jön létre sejtlízis, de a DNS replikáció folytatódik [168]. Sem a penicillin, sem az ampicillin nem képes eradikálni a chlamydiát [169]. Az amoxicillin aminopenicillin származék, elsősorban chlamydia infekcióval diagnosztizált várandós nőknél alkalmazzák [170].

A klinikumban a chlamydia ellenes kezelés alapját a makrolidek és tetraciklinek képezik. A makrolidek a bakteriális riboszóma 50S alegységéhez kötődve gátolják az aktív polipeptid

szintézist. Bakteriosztatikus hatásukat csak akkor képesek kifejteni, amennyiben a baktériumok aktív fehérjeszintézist folytatnak. Chlamydia fertőzés ellen elsősorban a clarithromycin, roxithromycin és az azithromycin bizonyult hatékonynak. Az azithromycin gyorsan és nagy mennyiségben képes a sejtbe penetrálni, magas szöveti koncentráció mellett relatív alacsony szérumszintet ér el [171].

A tetraciklinek szintén a fehérjeszintézis gátlásán keresztül ható antibiotikumok, a riboszóma 30S alegységéhez kötődve megakadályozzák a bakteriális aminoacil-tRNS kötődését az mRNS-riboszóma komplexhez. Viszonylag gyenge inhibitorként gátolja a proteinszintézist eukarióta sejtekben is. [172]. Terápiás szempontból a doxycyclint, tetracyclint és a minocyclint kell kiemelni. Mind a tetracyclin, mind a minocyclin alkalmazható non-gonococcális urethritis esetén. Genitális infekciónál hatékonysága és tolerabilitása megegyezik az azithromycinével, de egy héten keresztül kell szedni, szemben az utóbb említett makrolid egyszeri dózisával [173].

Fluorokinolonok közül klinikailag vizsgálták már a levofloxacint, az ofloxacint, a grepafloxacint, a trovafloxacint és a sparfloxacint *C. trachomatis*szal fertőzött betegekben. Ezek a DNS-giráz és topoizomeráz IV gátlók különösen hatékonyak olyan infekcióknál, mikor a chlamydia mellett gonococcus és mycoplasma is szerepel a kórokozók között. Baktericid hatású vegyületek. Nem javasoltak várandósság esetén és növésben lévő gyermekeknél sem [174].

1.9. A klinikai gyakorlatban gyakran használt készítmények és potenciális szerepük a chlamydia szaporodásában

Az N-acetyl-cysteint (NAC) széles körben használják a klinikai gyakorlatban pl. a pszichiátriában vagy acetaminophen túladagolás esetén. Mindezek mellett a leggyakrabban légúti megbetegedésekben alkalmazzák mint mukolitikumot, mert a szabad tiol csoportja hasítja a mucusban a diszulfid hidakat, csökkentve ezáltal annak viszkozitását. A NAC-ot leggyakrabban *per os* alkalmazzák, kivétel ez alól az acetaminophen toxikáció [175]. Az ambroxol (Ax), egy másik, gyakran igénybe vett nyákoldó. A mukolitikus hatása mellett lokális, anesztetikus hatással is rendelkezik, valamint leírták széleskörű gyulladást gátló hatását *in vitro* és *in vivo* rendszerben is [176]. A *C. pneumoniae* szaporodására gyakorolt szerepüket még nem vizsgálták.

Az inhalációs kortikoszteroidok (ICS) az asztma és a COPD kezelésében kiterjedten alkalmazott fenntartó terápiák, melyek csökkentik az exacerbációk rizikóját és a kislégutak gyulladását, továbbá elősegítik a légzésfunkciós paraméterek javulását is [177]. Az ICS-ek számos fajtája ismert, melyek, bár ugyanolyan megbízhatóak klinikai felhasználásukat tekintve, azonban eltérő farmakokinetikai, anti-inflammatorikus és immunszuppreszív hatásokkal rendelkeznek. Ennek következtében immunológiai hatásuk az egyes kórokozók által okozott betegségek lefolyásában eltérőnek mutatkozott [178].

A *C. trachomatis* átvitelének kockázatát nagymértékben befolyásolják a cervicovaginális mikrokörnyezet alkotóelemei, ideértve a hüvelyi lactobacillusokat és az indol pozitív baktériumokat [179]. A hüvelygélek síkosító anyagként vagy terápiás gélként kerülhetnek be

ebbe a környezetbe. A szexuális élet során használatos hüvelygélek térbeli és időbeli jelenlétük miatt jelentős hatásuk lehet a chlamydia fertőzés, és más nemi úton terjedő betegségek kialakulásában. A hüvelygélek fő alkotóeleme maga a gélképzőszer. A hidroxi-etil-cellulóz (HEC) egy általánosan használt gélképző szer, amely megtalálható a síkosító anyagokban és a terápiás gélekben egyaránt [180]. Annak tisztázására, hogy a HEC milyen hatással lehet a chlamydia átvitelére, szaporodására, megvizsgáltuk a HEC hatását a *C. trachomatis* D és E szerovariánsok esetén.

1.10. A humán cytomegalovírus (HCMV)

A *humán cytomegalovírus*, (HCMV) hivatalos nevén a *humán herpesvírus 5* a herpesvírus család, betaherpes vírus alcsaládjának a tagja. A herpesvírusok, duplaszálú, lineáris DNS tartalmú, ikozahedrális szimmetriát mutató, burokkal rendelkező vírusok. A család 8 humán pathogént foglal magába. A herpesvírusok világszerte előfordulnak, a velük szembeni szeropozítivitás 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 gazdában, és minimális aktivitást mutat. A herpesvírusok egy részénél a látencia helye pontosan definiálható pl. a HSV-1 esetében a trigeminalis ganglion, viszont a HCMV többféle sejttípusban, így a mononukleáris 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, sokszor 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 G 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 fejlődő 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 szervtranszplantáció alkalmával is átvihető. A pimer fertőzés általában tünetmentes, viszont jelentkezhet tünetek kíséretében. A CMV felelős a mononucleosis infectiosa esetek kisebb százalékáért az Epstein-Barr vírus fertőzést követően.

A jellegzetes exudatív pharyngitis mellett lymphadenitis lymphadenomegaliával, láz és hepatitis állhat fenn. A kórkép elhúzódó lehet, de általában jóindulatú, és a betegek teljesen felépülnek. 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 látensen megbújó CMV is reaktiválódhat, de maga a donor szerv is tartalmazhat vírust, mely megtámadhatja a recipienst. A HIV betegek esetében korábban a HAART (Highly Active Antiretroviral Therapy) bevezetése előtt a reaktiválódó CMV nagy gondot jelentett. Immungyenge egyénekben a CMV fertőzés leggyakrabban pneumonitist, hepatitist, colitis, oesophagitist, retinitist okoz. A CMV, a leggyakoribb anyáról magzatra transzplacentálisan átvihető vírus fertőzés, mely congenitális károsodáshoz vezet. Azok az anyák adhatják át a vírust a magzatnak a legnagyobb valószínűséggel, akik a terhességük első trimeszterében fertőződnek meg primeren a vírussal. A CMV okozta leggyakoribb congenitális 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, süketség, látásproblémák, valamint tanulási nehézségek mutatkoznak. Ezen utóbbi tünetek olyan gyermekeknél is jelentkezhetnek, akár 10 éves korukig, akik születésükkor még nem mutattak szimptómákat. 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 [181].

Az immunszupprimált betegekben okozott súlyos megbetegedések, a congenitális károsodást okozó képessége, valamint az egyre növekvő ganciklovir rezisztencia miatt is szükséges lenne egy hatékonyan működő, széleskörben alkalmazható CMV elleni vakcinára. Mivel az attenuált vírust tartalmazó vakcina kísérletek nem hozták az elvárásoknak megfelelő eredményeket, a vírus immunválaszt kiváltó antigénjeire helyeződött a vakcina kutatásokban a hangsúly. A különböző alapú vakcinák általában a vírus peplonjában elhelyezkedő glikoprotein B (gB)-re illetve a mátrixban található foszfoprotein 65 (pp65)-re fókuszálnak, mindkettő kivált humorális illetve celluláris választ a szervezetben. Ezen két strukturális fehérje mellett felmerült a szerepe a védelemben a vírusfertőzés igen korai időszakában kifejeződő IE-exon4-nak, a teljes korai protein (IE) hátránya, hogy esetlegesen transzaktiváló szereppel bírhat, viszont az exon4 alegységének nincs ilyen képessége. Jelenleg számos, különböző alapú CMV vakcina van fázis 1-3 kipróbálás alatt (attenuált vírus, rekombináns vírus, rekombináns protein, DNS, RNS alapú), nagy részük az általunk is tanulmányozott CMV alegységeket tartalmazza [182].

2. Anyagok és módszerek

2.1. Sejtkultúrák fenntartása

Kísérleteink során a következő sejtkultúrákat használtuk: HeLa229, HEp-2, McCoy, J774A, A549, Vero, Caco-2, P815, MC57, MRC-5 (American Type Culture Collection (ATCC), USA), egér fibroblaszt (a laboratóriumunkban előállított sejtkultúra 18 napos terhes egerek embrióinak tripszines emésztésével nyertük), primer csirke fibroblaszt (14 napig keltett tojásból származó embrió tripszines emésztésével készítettük) BM 12.4 (egér petevezető epitheliális sejt) Caldwell HD Professzor (Montana, USA) adománya. A sejtkultúrák fenntartására minimal essential médiumban (MEM) vagy RMPI-1640 tápfolyadékban történt, amit kiegészítettük 10% foetális borjú savóval (FCS), nem esszenciális aminosavakkal, L-glutaminnal (Sigma, St. Louis, MO, USA), diflucannal valamint a chlamydiák növekedését nem befolyásoló gentamycinnel (Sanofi Aventis, Hungary).

2.2. A chlamydiák szaporítása

C. trachomatis D (UW-3/CX), E (DK20) és L2 (434/BU) serovar, *C. muridarum* (Nigg) valamint a *C. pneumoniae* (TWAR-183 és CWL-029) (ATCC) és a cardiovasculáris eredetű CV6 (Caldwell HD Professzor adománya) törzs szaporítása McCoy, HEp-2 vagy HeLa229 sejtkultúrán történt. A sejtek fertőzése során a tápfolyadékot kiegészítettük még glükózzal, amely a chlamydiák szaporodását elősegíti. A chlamydiák adhézióját szolgálta a fertőzött lemezek 800*g*-n történő centrifugálása. Ezt követően a fertőzött sejteken lecseréltük a tápfolyadékot, melyhez cycloheximidet adtunk, mely gátolja az eukarióta sejtek fehérjeszintézisét, viszont nincs hatással a prokarióta chlamydiákra. A sejteket 3 napig inkubáltuk, majd belekapartuk a tápfolyadékba. Kellő volumenű fertőzött sejtkultúra szuszpenziót összegyűjtve, azt fagyasztottuk, olvasztottuk, valamint ultrahanggal kezeltük két alkalommal, hogy serkentsük a chlamydia EB-k kiszabadulását. Ezt követően a szuszpenziót lecentrifugáltuk (400*g*, 10 perc), majd a felülúszót ultracentrifugáltuk (30 000*g*, 30 perc). Az üledéket 180 μl sucrose-phosphate-glutamic acid (SPG) pufferben szuszpendáltuk fel. A kísérleteink során szükség volt úgy nevezett álfertőzésre (mock) is, amit kontrollként használtunk. Ennek a preparátumnak az előállítása ugyanúgy történt, mint a chlamydia inokulum előállítása, csak nem került a sejtekre chlamydia partikula.

2.3. A chlamydia mennyiségi értékmérése

A chlamydia mennyiségének meghatározását indirekt immunfluoreszcens (IF) módszerrel végeztük. Az ismeretlen számú baktériumot tartalmazó szuszpenzióból tízes léptékű hígítási sort készítettünk. A McCoy sejtkultúrát 24-lyukas, 13 mm-es kerek fedőlemezt tartalmazó tenyésztőedényben szaporítottuk olyan sűrűségben, hogy 24 óra múlva monolayert alkosson. A chlamydia hígítások rámérése előtt a tápfolyadékot glükózos tápfolyadékra cseréltük, és a hígításokból 250 μl-t mértünk a lyukakba. A lemezeket hasonló módon kezeltük, mint a

chlamydia szaporítás során (centrifugálás, cycloheximid hozzáadása). A lemezeket 48 óráig inkubáltuk, majd PBS-sel mostuk, ezt követően a fedőlemezeket eltávolítottuk, üveg Petri-csészébe helyeztük és szárítottuk. A szárítást követően fixálás céljából -20 °C-os acetont mértünk a lemezekre, és 10 percre -20 °C-os hűtőbe tettük. A PBS-sel történt rehidrálás után került rá az elsődleges chlamydia MOMP vagy LPS (AbD Serotec) specifikus monoklonális ellenanyag, mellyel 45 percig 37C°-on festettünk. Ezt követte a háromszori mosás, majd másodlagos ellenanyagként FITC-konjugált anti-egér ellenanyagot (Sigma) használtunk 30 percig. A lemezek mosása után Evans blue festéket alkalmaztunk a sejtek láthatóvá tételére. A chlamydia inklúziók számát UV mikroszkóp segítségével határoztuk meg. Az egy lemezen számolt mennyiséget szoroztuk 4-gyel és a hígítás fokával, és az adott törzs titerét inklúzió formáló egység (IFU)/ml-re adtuk meg.

2.4. Vírusok tenyésztése

A különböző, CMV fehérjéket kifejező, rekombináns canarypox (ALVAC-pp65, -pp150, -IE-exon4, -gB, -pp28) és vaccinia vírusokat (Vac-pp65, Vac-pp150, Vac-IE-exon4, Vac-gB, Vac-pp28) kooperációs partnerünk bocsátotta rendelkezésünkre. A canarypox vírusokat primer csirke fibroblaszton, a vaccinia vírust pedig Vero sejtkultúrán szaporítottuk és titráltuk plakk módszerrel, a titert plakk formáló egység (PFU)/ml-ben adtuk meg.

2.5. A *C. pneumoniae* antigén előállítása

A *C. pneumoniae* CWL-029 EB-ket fertőzött HEp-2 sejtből tisztítottuk sűrűség grádiens centrifugálással és formaldehiddel inaktiváltuk Penttila és mtsai. munkája alapján [183]. Az antigén fehérjetartalmát spektrofotometriás módszerrel határoztuk meg és használatig –80 °C-on tároltuk.

2.6. Antimikrobiális vizsgálatok

2.6.1. Chemokinek és növényi eredetű peptidek hatásának vizsgálata

A MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10 és I-TAC/CXCL11, valamint különböző növényi eredetű peptidek anti-chlamydiás hatásának vizsgálatára HeLa229, illetve HEp-2 sejteket fedőlemezt tartalmazó 24-lyukas lemezben növesztettünk. A $4x10^5$ IFU chlamydia EB-t 37C°-on rázatva inkubáltuk eltérő ideig MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10 és I-TAC/CXCL11 chemokinekkel, vagy antimikrobiális anyagok különböző mennyiségeivel (10, 5, 2.5, 1.25 μg). Kontrollként hőinaktivált chemokint használtunk. Az inkubációt követően a szuszpenziókat a sejtkultúrákra mértük, majd két napig inkubáltuk. Ezt követően a visszatenyészthető chlamydia mennyiségét indirekt IF módszerrel határoztuk meg.

A növényi eredetű peptidek esetében először ellenőriztük az esetleges citotoxikus hatásukat nem fertőzött HeLa229 sejtkultúrán, azokat a peptideket, amelyek toxikusnak bizonyultak, kizártuk a további vizsgálatokból. A teszt során a *C. trachomatis* EB-ket az alábbi szintetizált peptidekkel inkubáltuk:

NCR030 (AFLPTSRNCITNKDCRQVRNYIARCRKGQCLQSPVR pI = 10.37);
NCR044 (AFIQLSKPCISDKECSIVKNYRARCRKGYCVRRRIR pI = 10.32);
NCR055 (VNDCIRIHCKDDFDCIENRLQVGCRLQREKPRCVNLVCRCLRR pI = 9.21);
NCR095 (ELVCDTDDDCLKFFPDNPYPMECINSICLSLTD pI = 3.62);
NCR137 (MTLRPCLTDKDCPRMPPHNIKCRKGHCVPIGKPFK pI = 9.7);
NCR168 (YPFQECKVDADCPTVCTLPGCPDICSFPDVPTCIDNNCFCT pI = 3.61);
NCR169 (EDIGHIKYCGIVDDCYKSKKPLFKIWKCVENVCVLWYK pI = 8.45);
NCR183 (ITISNSSFGRIVYWNCKTDKDCKQHRGFNFRCRSGNCIPIRR pI = 10.1);
NCR192 (MKNGCKHTGHCPRKMCGAKTTKCRNNKCQCVQL pI = 9.54);
NCR247 (RNGCIVDPRCPYQQCRRPLYCRRR pI = 10.15); vagy
NCR280 (MRVLCGRDGRCPKFMCRTFL pI = 9.8) (Proteogenix Oberhausbergen, Franciaország). A különböző antimikrobiális peptidekkel kezelt chamydia EB-ket ezt követően ugyanúgy kezeltük, mint a MIG/CXCL9 esetén, vagyis fogékony sejtkultúrára helyeztük, és az inkubáció után meghatároztuk az élő és visszatenyészthető chlamydiák számát.

2.6.2. NAC és Ax kezelés in vitro rendszerekben

McCoy és A549 sejteket tenyésztettünk üveg fedőlemezt tartalmazó, 24-lyukas tenyésztő edényben. Öt párhuzamos sejtkultúrát fertőztünk $2x10^3$/lyuk *C. pneumoniae*val és kezeltünk változó mennyiségű NAC-cal (0.01–10 mg/ml) vagy Ax-szel (0.002–0.05 mg/ml) a fertőzés időpontjában. Másik sejtkultúrákat olyan *C. pneumoniae*val fertőztünk, melyet 1 órán át előkezeltünk különböző koncentrációjú NAC-cal. További kísérlet során a *C. pneumoniae* EB-ket NAC-cal vagy Ax-szel kezeltük folyamatos rázás mellett, 1 óra inkubációt követően a hatóanyagokat mosással eltávolítottuk, centrifugáltuk 13 800*g*-n (15 min) a sejtek másik részét mosatlanul hagytuk. A NAC vagy Ax kezelt *C. pneumoniae*t illetve a nem kezelt *C. pneumoniae*t ráoltottuk McCoy sejtkultúrára, majd további 48 óra inkubálás után a sejteket fixáltuk és a visszatenyészthető *C. pneumoniae* mennyiségét indirekt IF módszerrel határoztuk meg. Egy további kísérletben magát a sejteket kezltük egy nappal a fertőzés előtt, illetve a fertőzés után 24 vagy 48 órával. Annak vizsgálatára, hogy az NAC és az Ax, hogyan befolyásolja a *C. pneumoniae* sejthez való kötődését, McCoy és A549 sejteket fertőztünk, majd egy órás centrifugálás után fixáltunk, és a megtapadt EB-ket IF módszerrel detektáltuk. A fluoreszcencia intenzitásának mérésére az ImageQuantTL 8.1 programot használtuk.

2.6.3. A HEC in vitro hatásának vizsgálata

A HeLa229 sejteket 96-lyukú lemezre mértük, $4x10^4$ sejt/lyuk sűrűséggel, 100 µl tápfolyadékban. Másnap a 90%-ban konfluens sejteket megfertőztük *C. trachomatis* D szerotípusú UW-3/CX és *C. trachomatis* E szerotípus DK20 törzsekkel. A fertőzés előtt az EB-ket előinkubáltuk HEC tartalmú (Európai Gyógyszerkönyv 9.0 minőség [184], Molar Chemicals, Halásztelek, Magyarország), vaginális szimuláns pufferben [3.51 g/L NaCl, 1.40 g KOH, $Ca(OH)_2$ 0.222 g/L, szarvasmarha-szérumalbumin 0.018 g/L, tejsav 2.00 g/l, ecetsav 1.00 g/L, glicerin 0.16 g/L, karbamid 0.4 g/L, glükóz 5.0 g/L], valamint kontrollként HEC nélküli hüvelyi szimuláns

pufferben 1 órán, át 37 °C-on, 5% CO_2 koncentráció mellett [185]. A HEC hígításokat úgy állítottuk elő, hogy 30 mg HEC polimert feloldottunk 1 ml vaginális szimuláns pufferben, majd abból kettes léptékű hígítási sort készítettünk (az alkalmazott HEC koncentrációtartomány 1.5–0.023 tömeg/térfogat% volt). A hüvelyi szimuláns puffer pH-ját 4.2-re vagy 7.0-re állítottuk be. Az előinkubált chlamydia EB-ket glükózt tartalmazó tápfolyadékkal kiegészítve a sejtekre mértük, és egy órán át inkubáltuk. A fertőzés után a sejteket kétszer megmostuk PBS-sel, és hozzáadtunk 0,1 μg/ml cycloheximid tartalmú tápfolyadékot. 48 órás inkubálás után a chlamydia genomtartalmat qPCR-rel mértük, ahogy azt korábban leírtuk [186], és a chlamydia inklúziók számát a hagyományos vagy automata ChlamyCount immunfluoreszcens zárvány számlálással is detektáltuk, ahogy azt korábban közöltük [187].

2.6.4. A flutikazon propionát (FP) és a budezonid (BUD) hatásának vizsgálata A549 légúti epithel sejtekben

Az A549 humán légúti epithel sejteket előkezeltük FP-vel vagy BUD-dal, majd 24 órán át inkubáltuk (37°C, 5% CO_2). A kontroll sejteket nem kezeltük. A legmagasabb nem toxikus koncentrációkat (FP: 3,5 x 10^{-4} mM, BUD: 7 x 10^{-4} mM) MTT citotoxicitási teszttel határoztuk meg. A 24 órás kezelés után a lemezt kétszer mostuk PBS-sel, majd a sejteket *C. pneumoniae*val fertőztük (MOI: 0.01). A sejtekre 0,5% glükózt tartalmazó tápfolyadékot mértünk, a lemezt centrifugáltuk (800*g*, 60 perc), majd ismételten FP-t vagy BUD-ot adtunk a lyukakhoz. A kontroll fertőzött sejteket nem kezeltük. A fertőzés után a lemezeket 37°C-on, 5% CO_2 alatt 48 órán át inkubáltuk. Ezt követően a lemezt ismételten kétszer mostuk PBS-sel, és lemez lyukaiba 100 μL SPG oldatot adtunk. A lemezeket két ciklus olvasztás-fagyasztásnak vetettük alá, melyet gyors fagyasztás követett (-80°C, 15 perc), az így kapott sejtlizátumokat közvetlenül templátként használtuk fel a direkt qPCR vizsgálathoz, melynek segítségével a *C. pneumoniae* genom mennyiségére következtettünk [186].

2.7. A MIG/CXCL9 *in vitro* termelődésének indukálása

J774A egér macrophág sejteket, valamint a laboratóriumunkban előállított egér fibroblaszt kultúrát 24-lyukas lemezbe helyeztük olyan sejtszámmal, hogy 24 óra múlva monolayert alkossanak. A sejteket *C. pneumoniae* CWL-029 vagy cardiovasculáris eredetű CV6 törzsekkel fertőztük 0.5-ös multiplicitással, vagy hasonló mennyiségű hőinaktivált EB-vel kezeltük. A fertőzött, illetve kezelt sejtekhez különböző koncentrációban (10, 100, vagy 1000 IU/ml) rekombináns IFN-γ-t adtunk (Millipore, Bedford, MD, USA). Kontrollként kezeletlen sejtek szolgáltak. A különböző módon fertőzött és kezelt sejtek felülúszójából mintát vettünk 24, 48 illetve néhány kísérletben 72 óra múlva. A felülúszókat a centrifugálást követően -80 C°-on tároltuk cytokin és chemokin meghatározás céljára.

2.8. HeLa229 és Caco-2 sejtek fertőzése

A sejteket 6- (1×10^6 sejt/lyuk), 96- (4×10^4 sejt/lyuk), vagy a 24-lyukú tenyésztő lemezeken ($2{,}5\times10^5$ sejt/lyuk) (ez utóbbi 13 mm-es üveg fedőlemezt is tartalmazott) növesztettük. A

lemezeket 1 órán át, szobahőmérsékleten tartottuk, és azután éjszakán át inkubáltuk 5% CO_2 atmoszférában 37 °C-on. A sejteket ezt követően fertőztük chlamydiával 1-szeres vagy 5-szörös multiplicitással és centrifugáltuk. A tápfolyadékot ezután cycloheximid tartalmúra cseréltük. A 6-lyukú fertőzött lemezekhez nem adtunk cycloheximidet a humán beta defensin-2 (hBD-2) szekréció tesztelésére és az RNS expresszió elemzésének céljából. A DNS mennyiségének meghatározásához a 96-lyukú lemezeken a fertőzött sejteket cycloheximid tartalmú tápközegben vagy cycloheximidmentes közegben is inkubáltuk. A visszatenyészthető chlamydia mennyiségét indirekt IF tesztben határoztuk meg.

2.9. hBD-2 kimutatása *C. pneumoniae* fertőzött sejtek felülúszójából

A 24-lyukú lemezben szaporított (3 párhuzamos) és fertőzött Caco-2 sejtek felülúszóját a fertőzés utáni különböző időpontokban összegyűjtöttük. A hBD-2 termelődés kimutatására a sejtek felülúszóit hBD-2 ELISA kittel vizsgáltuk (Alpha Diagnostic, San Antonio, TX, USA). A hBD-2 mérési tartománya; 12.5–200 pg/ml volt. Pozitív kontrollként hőinaktivált *E. coli* Nissle 1917 törzs (amely a hBD-2 erős induktora) kezelt Caco-2 sejtek felülúszóját használtuk.

2.10. DC kultúra előállítása és fertőzése

Egészséges véradók véréből perifériás mononukleáris sejteket (PBMC) izoláltunk centrifugálással Ficoll-Paque PLUS (Amersham) sűrűség grádienst használva. A DC-ket adherens eljárást alkalmazva érleltük a vérben található monocytákból [106]. A nem kitapadó PBMC frakciót (mely főként lymphocytákból állt) összegyűjtöttük és fagyasztva tároltuk a felhasználásig. Az adherens sejteket 10% FBS-t tartalmazó RPMI-1640 tápfolyadékban tartottuk fenn. A könnyedén leváló sejteket 24 óra múlva begyűjtöttük, és olyan tápfolyadékba helyeztük, mely 800 U/ml rekombináns humán granulocyta-macrophág kolónia stimuláló faktort (rhGM-CSF) valamint 1000 U/ml rekombináns humán IL-4-et (R&D Systems Inc.) tartalmazott. A tenyésztés 7. napján a leváló éretlen DC-ket (iDC) összegyűjtöttük, majd centrifugáltuk és 6-7x10^5 sejt/lyuk koncentrációval 24-lyukú tenyésztő lemezbe helyeztük. Az iDC-k tisztasága kb. 90% volt, amit áramlási citometriás vizsgálat során ellenanyagok keverékét (lineage cocktail) használva bizonyítottunk. Az iDC-ket kétszeres (2x MOI) mennyiségű *C. pneumoniae*val fertőztük, kontrollként álfertőzött (mock) sejtek szolgáltak. A fertőzött sejteket 45 percig centrifugáltuk, majd a tápfolyadékot lecseréltük glükózt és gentamycint tartalmazó médiumra. Minden 4. napon a tápfolyadék felét kicseréltük frissre. A DC felületi markerek jelenlétét az 1., a 7. és a 10. napon ellenőriztük. A DC-k életképességét propidium-jodid festék közvetlenül az áramlási citometriás teszt előtti hozzáadásával vizsgáltuk.

2.11. A DC kultúrák cytokin termelése

A DC-k IFN-γ termelését kétféle módon is bizonyítottuk. A *C. pneumoniae* fertőzött DC-k felülúszójának cytokin tartalmát ELISA módszert használva a gyártó utasításai szerint meghatároztuk (OptEIA; BD Pharmingen). Az IFN-γ mérés érzékenysége 9.4 pg/ml volt. A fertőzött sejtek tápfolyadékához az IFN-γ tartalmának neutralizálására 20 μl/ml anti-humán

IFN-γ monoklonális ellenanyagot mértünk (Serotec). A tápfolyadék TNF-α tartalmának neutralizálására anti-TNF-α ellenanyagot használtunk (12 μg/ml, Abcam). A DC-kben intracellulárisan található IFN-γ kimutatására áramlási citometriás vizsgálatot végeztünk. GolgiPlug (BD Pharmingen, 10 μg/10^6 sejt) inhibitort (mely meggátolja a cytokinek felszabadulását) adtunk a DC sejtekhez 6 órával a begyűjtés előtt. A sejtek összeszedését és mosását követően a sejteket lineage coctail-lal, CD11c, valamint HLA-DR felszíni molekulákra specifikus ellenanyagokkal festettük, majd paraformaldehiddel fixáltuk, szaponinnal permeabilizáltuk és anti-humán PE-IFN-γ ellenanyaggal festettük (BD Pharmingen). A festődést áramlási citometriás vizsgálattal detektáltuk.

2.12. MIG/CXCL9 illetve szintetizált peptidek kötődésének vizsgálata áramlási citometriás módszerrel

Annak kiderítésére, hogy a natív chlamydia EB-k képesek-e a MIG/CXCL9 illetve növényi peptidek kötésére, 1x10^6 IFU chlamydia EB-t inkubáltunk 10 μg rekombináns MIG/CXCL9 vagy FITC-jelölt antimikrobiális peptid jelenlétében két órán át. A MIG/CXCL9-cel kezelt EB-ket a mosást követően PE jelölt anti-MIG/CXCL9 poliklonális ellenanyaggal kezeltük. A festést követően a sejteket FACS StarPlus készülék segítségével analizáltuk.

2.13. Az egerek fertőzése, kezelése, immunizálása

Kísérleteink során BALB/c, illetve C57BL/6N 6-8 hetes nőstény egereket használtunk (Charles River Laboratories, vagy Innovo Kft. Magyarország) általában. A különböző kísérleteinkben az egerek száma változott. A reinfekciós kísérletünkben 6-8 hetes egereket intranasálisan fertőztünk 7.5x10^5 IFU *C. pneumoniae* (TW183, ATCC) törzzsel egy, két vagy három alkalommal altatásban (sodium pentobarbital). A kontroll egereket azonos térfogatú álfertőző, mock preparátummal oltottuk. Az egy inokulálásban részesült egerek egy-egy csoportját a fertőzést követő 1. és 2. napon valamint az 1., 2., 4., 8., 10., 16., 18., 24., 36., 49. héten feláldoztuk és mintát vettünk belőlük. Az egerek egy csoportját újrafertőztük a 8. héten és ezt követő 1. és 2. napon valamint az 1., 2., 4., 8. héten a feláldozást követően történt a mintagyűjtés. Az egerek egy további, harmadik csoportját ismételten fertőztük a 16. héten és az ezt követő 1. és 2. napon, valamint az 1., 2., 4., 8., 20., 28. és 33. héten a feláldozást követően mintát nyertünk belőlük. Minden időpontban két mock oltott egér is feláldozásra került.
Az IL-17 cytokinek *in vivo* szerepének tisztázására BALB/c egereket 5x10^5 IFU *C. pneumoniae*val (CWL-029) intranasálisan oltottunk. Az egerek leölése az 1., 2., 4., 7., 14. és 28. napon történt. Ehhez a kísérlethez kapcsolódóan egy másik csoportját az egereknek *C. pneumoniae*val illetve hasonló mennyiségű hőinaktivált *C. pneumoniae*val (a hőkezelés során a *C. pneumoniae*t 90 °C-on tartottuk 30 percig, a kezelt chlamydia életképességét kizártuk visszatenyésztéses vizsgálattal) oltottuk. A *C. pneumoniae*val oltott csoportot kettéválasztottuk, az egerek felét további két alkalommal élő *C. pneumoniae*val oltottuk 4 hetes időközökkel, míg az egerek másik felét hőinaktivált *C. pneumoniae*val kezeltük ugyanolyan időközönként. Olyan kontroll csoportot is beállítottunk, mely első inokulálásra is hőinaktivált *C. pneumoniae* kezelésben

részesült, melyet további két hőinaktivált chlamydia oltás követett. Az egereket (7 db/csoport) a kezelések után 2 és 4 héttel áldoztuk fel.

Az IL-17 szerepének további vizsgálatára intranasálisan oltottunk $1x10^3$ IFU *C. muridarum*mal BALB/c egereket, majd egy részüket a 28. napon újrafertőztük, az egereket az első fertőzést követő 1., 7., 14., 28., 29., 35., 42. és 56. napokon áldoztuk fel.

A MIG/CXCL9 *in vivo* expressziójának kimutatására BALB/c egereket fertőztünk *C. pneumoniae* (CWL-029) törzzsel intranasálisan és az egerek leölése az 1., 2., 4., 7., 14. és 28. napon történt.

A *C. muridarum* plazmid gének kifejeződésének vizsgálatára kétféle egértörzset használtunk. Nőstény C57BL/6N és BALB/c egereket inokuláltunk $1x10^3$ IFU *C. muridarum*mal, majd a fertőzést követő 1., 7., 14., 28. és 56. napon kerültek feláldozásra. Az egerek egy-egy elkülönített csoportját háromszor oltottuk *C. muridarum*mal 4 hetes időközönként, majd minden oltást követően 2 héttel 10-10 egeret feláldoztunk mindkét vizsgált egér törzsből.

A pGP3 és pGP4 rekombináns proteinek immunogén és protektív szerepének tisztázására C57BL/6N egereket immunizáltunk subcutan faroktőbe 20 μg rekombináns proteinnel alumínium-hidroxid (Alum) adjuvánssal keverve 3 alkalommal, 3 hetes időközökkel. Csak Alummal oltott állatok szolgáltak kontrollként. Két héttel az utolsó immunizálást követően az egerektől a retrobulbáris vénásköteg megszúrásával vért vettünk a specifikus ellenanyagok tesztelésére, a *C. muridarum in vitro* neutralizálására, valamint későbbi passzív immunizálás céljából. Minden csoportból 10 egeret feláldoztunk, a maradék egereket intranasálisan fertőztük $2x10^3$ IFU *C. muridarum*mal, 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 200 μl immunizált állatokból származó szérummal a fertőzést megelőzően 24 és 1 órával, valamint a fertőzést követően 24 órával. Az állatok a fertőzés 7. napján kerültek feláldozásra. Egy másik kísérletben a *C. muridarum* EB-ket ($2x10^3$ IFU) *in vitro* kevertük össze pGP3 és pGP4 immunizált egerek savóival, majd az ezt követő 1 órás inkubáció után intranasálisan fertőztük az egereket. A védelem tesztelése céljából ezen egereket is a kezelés utáni 7. napon áldoztuk fel.

A *C. pneumoniae* LcrE elleni immunválasz protektivitásának vizsgálatára 25 BALB/c egeret immunizáltunk csoportonként subcutan módon faroktőbe 20 μg LcrE fehérjét és Alum vagy Freund adjuvánst (Chemicon International, Temecula, CA, USA) tartalmazó keverékkel. Az első immunizálást 3 hetes időközönként egy 2. és 3. vakcinálás követte, melynek során inkomplett Freund adjuvánst használtunk. Két héttel az utolsó immunizálást követően a kezelt és a nem kezelt egereket intranasálisan fertőztük $4x10^5$ IFU *C. pneumoniae*val. A fertőzést megelőzően 5 egeret minden csoportból leöltünk és a lépüket feldolgoztuk későbbi vizsgálatokra. Valamennyi egérből a fertőzés előtt a retrobulbáris plexusból vért vettünk. A megmaradt egereket a fertőzés utáni 7. napon öltük le.

A *C. pneumoniae* atherosclerosis indukáló aktivitásának vizsgálatára a kísérleteink során 8-9 vagy 14-15 hetes ApoB100only/$LDL^{-/-}$(B6.129S-ApoE tm1Her Apob tm2Sgy/J) és 14-15 hetes ApoE hiányos ($ApoE^{-/-}$, B6.129P2-Apoe tm1Unc/J) egereket használtunk. A B6.129S-LDLr

tm1Her apoB tm2Sgy/J szülőpárt a Jackson Laboratory-tól (Bar Harbor, ME, USA) a B6.129P2 ApoE tm1Unc/J szülőpárt pedig a Charles River Laboratories-tól (Sulzfeld, Németország) szereztük be. Tekintettel arra, hogy számos, az atherosclerosissal kapcsolatos tanulmányban használtak nőstény egereket [188] [189], továbbá azt is kimutatták, hogy mindkét egér törzs nőstény egereiben kialakul az atherosclerosis, az $ApoE^{-/-}$ egerekben nincs különbség a nemek között, és az $ApoB100only/LDLR^{-/-}$ egerekben kevésbé kiterjedt léziók fordulnak elő nőstényekben, mint a hímekben [109] [111]; úgy döntöttünk, hogy nőstény egerekkel dolgozunk.

A fertőzést követő 12 héten keresztül az egereket normál rágcsálótápon (VRF1, Altromin GmbH & Co. KG, Lage, Németország) vagy magas zsír-/koleszterintartalmú étrenden, (amely 21% tejzsírt és 1,25% koleszterint tartalmaz) (Altromin GmbH & Co. KG) tartottuk. Az egereket intranasalisan fertőztük háromszor, 2 hetes időközönként 2×10^5 IFU *C. pneumoniae*val. Egy héttel minden fertőzés után és a kísérlet végén, a 12. héten vért nyertünk a retroorbitális plexusból érzéstelenítés alkalmazása mellett. 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 kontroll állatokat fertőzés nélkül hagytuk.

A triptofán metabolizmus tanulmányozására az egereket 4×10^5 IFU *C. pneumoniae*val (BALB/c) vagy 1×10^3 IFU *C. muridarum*mal (BALB/c és C57BL/6) fertőztük. Az egereket a fertőzés után 7 nappal feláldoztuk. Az egyes homogenizált tüdők felét teljes RNS kivonásra, a másik felét 1 ml SPG-ben szuszpendálva a visszatenyészthető chlamydia kimutatására, valamint a kinurenin és a triptofán arányának vizsgálatára dolgoztuk fel. Mindkét csoportból három egér tüdejét 10%-os formalin oldattal (Sigma) fixáltuk kórszövettani vizsgálat céljából. Az IDO kifejeződésének gátlása céljából 7 nappal a *C. muridarum* fertőzés előtt a BALB/c egerek (n=4) ivóvízét 2 mg/ml IDO-gátló, 1-metil-DL-triptofán (1-MT; Sigma) tartalmú (melyet 10 mmol/l NaOH-ban oldottunk) Stevia édesítőszerrel kiegészített vízre cseréltük. A kontroll egerek (n=4) Steviaval édesített ivóvizet kaptak. Az egerek tüdejéből visszanyerhető, életképes *C. muridarum* meghatározását a fertőzés után 7 nappal végeztük.

Az NAC és Ax hatásának vizsgálatára BALB/c egereket fertőztünk intranasalisan $2x10^5$ *C. pneumoniae*val és ezt követően 0.2 mg ivóvízben elkevert NAC-cal kezeltük az állatokat *per os* minden nap. Az egereket a 7. napon, egy másik kísérletben a 20. napon feláldoztuk. Egy további munkánkban az egereket a fertőzést követően Ax-szel (25 μg) itattuk naponta. A kontroll egerekkel az itatás okozta stressz mimikálására 50 μl ivóvizet adagoltunk Gilson pipetta segítségével.

A HEC hatásának *in vivo* monitorozására 6-8 hetes nőstény BALB/c egereket subcutan kezeltünk 2,5 mg medroxyprogesteron acetáttal (Pfizer, Budapest, Magyarország) egy héttel a fertőzés előtt. Az egereket HEC-cel kevert 1×10^5 IFU *C. trachomatis* D szerovariánssal, a kontroll egereket HEC kezeletlen chlamydiával intravaginálisan oltottuk. A visszanyerhető IFU-kat a cervicovaginális mosást követően, 3 nappal a fertőzés után tradicionális IF módszerrel állapítottuk meg.

Az FP és a BUD hatásának vizsgálata céljából kísérleteink során nőstény BALB/c egereket vizsgáltunk. Az egereket véletlenszerűen három csoportra osztottuk: a kontroll, a BUD-dal és az FP-vel kezeltekre (mindegyik csoportba 16 egér került). FP és BUD oldására dimethyl sulfoxide (DMSO)-ot használtunk. Az egerek inhalációs kezelése BUD-dal (40 μg, 1000 μg/kg) és FP-vel (25 μg, 625 μg/kg) naponta, 15 percen keresztül történt inhalációs kamrában [190]. Az inhalált dózisok ekvivalens koncentrációja korábbi tanulmányok alapján kerültek meghatározásra, az FP jelentősebb hatásai miatt, FP:BUD=1:1.6 arányt vettük alapul [191] [192]. Az egerek BUD-ot, FP-t vagy PBS-t inhaláltak a fertőzés előtt három napig, majd a fertőzést követően további hét napig. A 3. napon az egereket elaltattuk és $5x10^5$ IFU *C. pneumoniae*val fertőztük meg. A 10. napon, azaz a fertőzés után hét nappal az egereket ismételten elaltattuk, majd feláldoztuk. A tüdőket eltávolítottuk és steril homokkal eldörzsöltük. A homogenizált tüdők egyik felét a teljes RNS kivonásra készítettük elő, a másik felét 1 ml SPG-ben szuszpendáltuk a visszatenyészthető *C. pneumoniae* kimutatására és a cytokin szintek meghatározására.

Az egerek DNS immunizálásához szükséges CMV (pVR-gB, pVR-gBΔtm, pVR-pp65) és az IFN-α-t (pIFN-α) kifejező plazmidokat Gönczöl Éva professzor bocsátotta rendelkezésünkre. Kísérleteink során BALB/c és CBA nőstény egereket használtunk. A DNS immunizálást kétféle módon végeztük. 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 plazmid preparátumok endotoxinmentesek voltak, melyet E-Toxate Limulus Amebocyte Lysate assay (Sigma, St. Louis, MO) segítségével ellenőriztünk.

A különböző kísérleteink során az állatokat a fertőzés utáni eltérő napokon cardiális punkciót alkalmazva áldoztuk fel. A vérüket heparinos csőbe tettük. A szérumokat fagyasztva tároltuk különböző chlamydia vagy CMV specifikus immunglobulinok, valamint cytokinek kimutatása céljából. A tüdejüket eltávolítottuk, majd steril tengeri homokkal homogenizáltuk, és két részre osztottuk. Az egyik részből teljes RNS kivonást végeztünk. A tüdő cytokin tartalmának, az immunglobulin valamint a visszatenyészthető chlamydia mennyiségi meghatározására a homogenizált tüdő másik részéhez 1 ml tápfolyadékot adtunk. Némely kísérletünkben az állatok lépét az eltávolítást követően szitán eldörzsöltük, majd többszörös mosást követően tripánkék festék segítségével megszámoltuk a mononukleáris sejteket. Az állatokból származó különböző mintákat a felhasználásig -80 °C-on tároltuk. Valamennyi állatkísérletünk rendelkezett a Csongrád Megyei Kormányhivatal, Élelmiszerlánc-biztonsági és Állategészségügyi Igazgatóság engedélyével.

2.14. A chlamydia infektív titerének meghatározása egértüdőben

A tüdőszuszpenziókat két cikluson keresztül olvasztottuk, fagyasztottuk és ultrahangoztuk, majd tízes léptékű hígítási sort készítettünk belőlük. A különböző tüdőhígításokat kerek fedőlemezzel ellátott McCoy/HEp-2 sejtkultúrára helyeztük és hasonló módon jártunk el, mint

a chlamydiák szaporításánál. A visszatenyészthető chlamydia mennyiségét indirekt IF teszttel határoztuk meg.

2.15. Cytokin szintek mérése a fertőzött egerek tüdejéből ELISA módszerrel

A chlamydiával fertőzött egerek homogenizált tüdejét lecentrifugáltuk (5 perc, 12 000*g*), 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-γ és IL-6 tartalmat OptEIA ELISA szettek (BD Biosciences Pharmingen) segítségével mértük. Az IFN-γ szett szenzitivitása: 15.6-1000 pg/ml, az IL-6 szett szenzitivitása: 125-1000 pg/ml volt.
Az IL-17 cytokin család kifejeződésének vizsgálatára végzett kísérletünkben az egér tüdők IL-17A, KC, LIX és MIP-2 tartalmának kimutatására Quantikine® egér chemokine/cytokine kiteket (R&D Systems), az IL-4, IL-10, IL-12, IL-17E és IFN-γ detektálására Ready-SET-Go! kiteket használtunk (eBioscience Inc., San Diego, CA, USA). A különböző kitek szenzitivitása a következőképpen alakult: IL-17A: 10.9–700 pg/ml, KC: 15.6–1000 pg/ml, LIX: 15.6–1000 pg/ml, MIP-2: 7.8–500 pg/ml, IL-4: 7.8–500 pg/ml, IL-10: 62.5–4000 pg/ml, IL-12: 31.2–2000 pg/ml, IL-17E: 31.2–2000 pg/ml és az IFN-γ esetében 11.72–1500 pg/ml volt. Minden felülúszót két párhuzamos tesztben vizsgáltunk, a kísérletek során a gyártó által előírt utasításokat követtük.
A *C. pneumoniae* fertőzött, FP vagy BUD kezelt egerek homogenizált tüdőszövetek felülúszóit centrifugáltuk és az IFN-γ, IL-4, IL-10, IL-17A, MIG/CXCL-9 ELISA-t a gyártó utasításainak megfelelően végeztük. A MIG/CXCL-9 koncentrációt egér MIG/CXCL-9 ELISA kit alkalmazásával határoztuk meg, az IL-17A-t Quantikine egér IL-17 ELISA kittel mértük. Az IFN- γ, IL-4 és IL-10 koncentrációkat Invitrogen egér ELISA kitekkel detektáltuk. Az IFN-γ, IL-4, IL-10, IL-17A és MIG/CXCL-9 mérések detektálási érzékenységi tartománya a következők voltak: 15-2000 pg/mL, 4-500 pg/mL, 32-4000 pg/mL, 10.9-700 pg /mL, illetve 2.741-2000 pg/ml.

2.16. A triptofán/kinurenin koncentráció arányának mérése a tüdőszövetekben

A fertőzött és a kontroll BALB/c és C57BL/6 egerek 480 µl tüdőszövet homogenizátum felülúszójához 20 µl belső standardot (3-nitro-L-tirozin (3NLT, Sigma) adtunk 2,5 tömeg%-os perklórsavban, és kiegészítettük még 500 µl perklórsavval. A mintákat ezt követően 12 000*g*-n 10 percig 4 °C-on centrifugáltuk, és a felülúszókat összegyűjtöttük a méréshez. A minták triptofán és kinurenin koncentrációit Hervé és munkatársai [193] módszere alapján számszerűsítettük, kis módosításokkal [194].

2.17. 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 (R&D Systems) immunglobulinnal (izotípus kontroll) (100

μg/egér/alkalom) kezeltük intraperitoneálisan. Az állatokat a fertőzést követő 1. és 4. napon áldoztuk fel, szerveiket a fent említett módon feldolgoztuk.

2.18. Bronchoalveoláris lavage (BAL) sejtes elemeinek vizsgálata

A feláldozást követően az egerek tüdejét 1 ml PBS-sel átöblítettük. 50 μl $5x10^5$ sejt/ml szuszpenziót tárgylemezre helyeztünk, majd 3 percig centrifugáltuk (800*g*). A fixálást követően May-Grünwald-Giemsa festést végeztünk és megszámoltuk a különböző fenotípusú sejt populációkat.

2.19. Chlamydia fertőzött egér tüdők hisztopatológiai analízise

A *C. muridarum*mal fertőzött egereket a fertőzést követő 4. héten elaltattuk, majd cardiális punkcióval elvéreztettük, a tüdejüket PBS-sel perfundáltuk, egyben eltávolítottuk, és fagyasztó médiumba, OCT-be helyeztük (Sakura Finetek Europe, Alphen aan den Rijn, Hollandia). A tüdőkből 5 μm-es metszeteket készítettünk. A fixálást követően a mintákat monoklonális anti-IL-17E ellenanyaggal (Acris Antibodies GmbH, Herford, Németország) 45 percig, majd 30 percig FITC-konjugált anti-egér IgG ellenanyaggal (Sigma) kezeltük.
A pGP3 és pGP4 fehérjével immunizált egerek tüdejét, csoportonként hármat, a fertőzést követő 14. napon, a perfundálást követően egyben eltávolítottuk és OCT fagyasztófolyadékba helyeztük. A mintákból metszeteket készítettünk és haematoxylin-eosinnal (H&E) festettük.
Az IDO1 és IDO2 immunhisztokémiai vizsgálatokat fertőzött BALB/c egerek tüdejéből végeztük. A makroszkopikusan gyulladt tüdőrészeket és a kontroll tüdőket kivágtuk és fixáltuk 10%-os formalinban. A fixált mintákból 4 μm-es metszeteket készítettünk. Ezt követően azokat először paraffin-mentesítettük, majd feltártuk az antigént, és az endogén peroxidázok gátlására EnVision FLEX peroxidáz-blokkoló reagenst használtunk (Dako, Carpinteria, CA, USA). Az IDO immunhisztokémiai vizsgálata során kecske poliklonális anti-IDO1 (Sigma) és nyúl poliklonális anti-IDO2 ellenanyagokat alkalmaztunk első ellenanyagként (Bioss, Woburn, MA, USA), majd a detektálást HRP-vel konjugált kecske ellenes nyúl (Dako) és anti-nyúl kecske szekunder ellenanyagokkal végeztük (Dako).

2.20. Az egér szövetminták preparálása az atherosclerosis fokának mérése

Tizenkét héttel az első *C. pneumoniae* fertőzés után az egereket feláldoztuk. A szívet és az aortát 10% 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 kipreparáltuk. A szív felső részét paraffinba ágyaztuk és morfometriai analízishez metszettük, Paigen és munkatársai által leírt módszer szerint [195]. Az aorta sinus végétől 10 μm-es metszeteket készítettünk addig, amíg a billentyű csonkok eltűntek, és ezeket H&E-vel megfestettük. Az aorta gyökről a képeket (8 metszet/egér) fénymikroszkópia során (Leitz optikai mikroszkóp) Olympus C-7070 digitális

fényképezőgép segítségével készítettük. Az aorta lumen plakkokkal borított kerületének hosszát és a plakk által elfoglalt aorta lumen területét JMicroVision szoftverrel elemeztük. Az aorta ívet és a leszálló aortát eltávolítottuk a környező szövetekből és hosszirányban felnyitottuk. Az aortákat sima, fekete műanyag felületre fektettük, és a hosszirányban felmetszett erek képeit ugyanazon megvilágítás, nagyítás és fókusztávolság alkalmazásával CMOS kamera (DCM 510; pixelméret: 2,2 µm×2,2 µm, 2592×1944 képpont; 5 Mpixel; Hangzhou Scopetek Opto-Electric Co., Ltd., Hangzhou, Zheijang, Kína) és a ScopePhoto szoftver (Hangzhou Scopetek Opto-Electric Co., Ltd.) segítségével nyertük. Az atherosclerosis mértékének meghatározására az erek luminalis felületéről digitális képet készítettünk, amelyen a plakk területét a JMicroVision szoftver segítségével körberajzolva, kiszámoltuk a plakk által fedett lumen százalékát.

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

A *C. pneumoniae* reinfekciós és az atherosclerosis kialakulására irányuló kísérletünk egereinek szérum mintáit minden fertőzés után egy héttel begyűjtöttük, és a kísérlet végén két alkalommal megvizsgáltuk a *C. pneumoniae* specifikus IgG, IgM és IgA szinteket a laboratóriumunkban kifejlesztett ELISA teszt segítségével. A tesztben antigénként NP-40 kezelt részlegesen tisztított *C. pneumoniae*t és hasonló módon kezelt HEp-2 kontroll készítményt alkalmaztunk. A teszt során Nunc Maxisorp ELISA lemezeket kezeltünk *C. pneumoniae* és mock antigénnel (0.625 µg fehérje 50 µl PBS/lyuk), és egy éjszakán át 4 °C-on inkubáltuk. A blokkolást 1%-os tejjel végeztük 1 órán át. A szérummintákat 0.4%-os tejes PBS-ben hígítottuk. Az egér IgG, IgM és IgA detektálása HRP-anti-egér IgG-vel (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA), anti-egér IgA-HRP-vel (Sigma) és anti-egér IgM-HRP (ab97260, Abcam, Cambridge, UK) antitestekkel történt. A *C. pneumoniae* antigénen mért optikai sűrűséget (OD) korrigáltuk a kontroll antigénen mért OD értékekkel. A *C. pneumoniae* specifikus IgG antitest titereket úgy határoztuk meg, hogy a szérummintákat kétszeres hígítás sorozatával teszteltük a *C. pneumoniae* és a kontroll ELISA antigénen. A hígítás reciprokát véve kiszámoltuk a szérumminták titerének geometriai átlagát. A *C. pneumoniae* specifikus IgM és IgA szint meghatározására szérummintákat 1:50 hígításban teszteltük. A kialakult színintenzitást ELISA olvasó készülékkel detektáltuk.

2.22. Szérum lipoprotein analízis

Az egerek szérum mintáiban az összkoleszterin, trigliceridek, nagy sűrűségű lipoprotein (HDL) és LDL koleszterin szintjét a Szegedi Tudományegyetem Laboratóriumi Medicina Intézetében határozták meg.

2.23. Transzmissziós elektronmikroszkópia (TEM)

A HeLa229 és Caco-2 sejteket 6 lyukas lemezeken tenyésztettük és chlamydiával fertőztük 1xMOI-val. 24, 48 és 72 óra elteltével a fertőzött sejteket megmostuk 3 ml PBS-sel, és azokat tripszinnel végzett kezelés után összegyűjtöttük. Ülepítés után (400*g*, 5 perc) a sejteket

fixáltuk 2% glutáraldehiddel és 1%-os ozmium-tetroxiddal egy éjszakán át 4 °C-on. A mintákat beágyaztuk Embed 812 közegbe (EMS, Hatfield, PA, USA) a TEM beágyazási protokoll szerint. Ultravékony metszeteket (70 nm) az Ultracut S ultra-mikrotom (Leica, Bécs, Ausztria) segítségével kaptunk.
A humán artéria cerebri media szakaszok vizsgálatára 5 *C. pneumoniae* nPCR pozitív valamint 4 *C. pneumoniae* nPCR negatív artéria mintákat OsO_4-vel fixáltuk és Eponba ágyaztuk. A *C. pneumoniae*val fertőzött McCoy-sejteket hasonló módon kezeltük a morfológiai összehasonlítás céljából. Uranil-acetáttal és ólom-citráttal történő festés után a metszeteket Philips CM10 elektronmikroszkóppal vizsgáltuk az SZTE Pathológiai Intézetében.

2.24. Az IL-17A termelő sejtek fenotípusának meghatározása ELISPOT módszerrel

Annak kiderítésére, hogy milyen fenotípusú sejtek termelik az IL-17A-t, a lépsejteket negatív szelekciónak vetettük alá. A *C. pneumoniae*val fertőzött és fertőzetlen egerek lépét egyben eltávolítottuk, majd szita segítségével eldörzsöltük. A lépsejtek azonos sejtszámú (10^7) csoportjait anti-CD4, a másikat anti-CD8 specifikus monoklonális ellenanyaggal borított, mikrogyöngyökkel, a harmadikat mindkettővel [CD4 (L3T4) és CD8a (Ly-2), Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Németország] kezeltük, és a sejteket mágneses sejtszeparáló rendszert (MACS, Miltenyi) használva negatívan szelektáltuk. A depléció eredményességét áramlási citometriás vizsgálattal ellenőriztük anti-CD4-Tricolor (TC) és anti-CD8-rPE (Caltag Laboratories) ellenanyagokat használva. A különböző csoportokban a megmaradt $CD4^+$ és $CD8^+$ sejtek száma <1% volt. A fertőzött egerek lépsejtjeiből ezek mellett még egy olyan sejtekből álló kontroll csoportot is képeztünk, amelyen nem alkalmaztunk sejtszeparáló rendszert (nem szelektált), valamint egy olyan csoportot, amelynek sejtjeit átengedtük a mágneses szeparáló oszlopon, de előtte ellenanyaggal nem kezeltük. Kísérleteink során IL-17A specifikus ELISpot kitet használtunk (R&D Systems). IL-17A telítő ellenanyaggal kezelt lyukakba mértünk $5x10^5$ mennyiségű *C. pneumoniae*val stimulált lépsejtet. 4 óra múlva a lemezeket megmostuk és hozzáadtuk a biotinilált detektáló ellenanyagot, a HRP-vel jelölt streptavidint és a szubsztrátot. A keletkezett foltok (spotok) számát három párhuzamos alapján sztereomikroszkóp segítségével határoztuk meg, és a középértéket extrapoláltuk 1 millió sejtre (spot formáló sejt (SFC)/1 millió sejt).

2.25. A lépsejtek negatív szelekciója és adoptív transzferük

Adoptív transzfer céljából a pGP3 és pGP4 proteinekkel immunizált C57BL/6N egereket az utolsó immunizálást követően feláldoztuk, és a lépüket egyben eltávolítottuk, majd szitán eldörzsöltük. A vörösvértesteket ACK lysisBuffer (Lonza, Basel, Swiss) segítségével 10 percig kezelve szobahőmérsékleten lizáltuk, majd a sejteket PBS-be helyeztük. A lépsejteket az előzőekhez hasonló módon mágneses szeparálásnak vetettük alá, negatívan szelektáltuk. A depléció sikerességét áramlási citometriás vizsgálattal ellenőriztük. Ezt követően naiv C57BL/6N egereken adoptív transzfert végeztünk ($1x10^6$ CD4-re vagy CD8-ra depletált sejtet adtunk egerenként) a farokvénán keresztül. Az adoptív transzfert követően az egereket 24 óra

múlva fertőztük $2x10^3$ IFU *C. muridarum*mal, majd 7 nappal később feláldoztuk őket. A visszatenyészthető chlamydia mennyiségét IF módszerrel határoztuk meg.

2.26. A *C. pneumoniae* plazmid valamint az *lcrE* gének klónozása, a fehérjék túltermeltetése

A *C. pneumoniae* CWL-029 törzsének DNS-ét használva templátként, az *lcrE* 1218-bp DNS szakaszát (GenBank ID 15618244, Locus tag CPn 0324) PCR során amplifikáltuk, klónoztuk és expresszáltattuk. A PCR reakciót a GeneAmp II (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) thermocyclerben végeztük Advantage GCcDNA polymerase (Clontech, Mountain View, CA, USA) segítségével, a gyártó által előírt amplifikációs kondíciókat alkalmazva. Az amplikont NdeI és BamHI enzimekkel emésztettük és p6HisF-11d (icl) pET vektorba [196] inszertáltuk, ugyanazokat az enzimeket használva az emésztés során, amivel az *icl* gén eltávolításra került. A túltermeltetéshez használt *E. coli* HB101 (Invitrogen, Carlsbad, CA,USA) törzset Tabor és Richardson módszere alapján kezeltük [197]. Röviden összefoglalva, a plazmidot hordozó baktériumokat 32 °C-on szaporítottuk LB tápfolyadékban antibiotikum jelenlétében. A proteinek túltermelésének indukciójára a baktérium tenyészetet 42 °C-on tartottuk 20 percig, az indukciót követően a hőmérsékletet csökkentettük 37 °C-ra és 90 percig tartottuk ott, majd a sejteket lecentrifugáltuk és az üledéket -20 °C-on tartottuk felhasználásig.
C. muridarum Nigg törzset használva templátként a 723 bp fragmenst tartalmazó TCA04 és 309 bp fragmenst tartalmazó TCA05 (GenBank ID 10957566:4703–5425, Locus tag TCA04 és GenBankID 10957566:5494–5802, Locus tag 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 [196]. A fehérje túltermeltetéshez szintén az *E. coli* HB101 törzset használtuk.

2.27. A rekombináns fehérjék tisztítása

A lefagyasztott *E. coli* lizátumot az olvasztást követően reszuszpendáltuk CelLytic B-II (Sigma) lízis pufferben, proteáz inhibitor (Sigma) jelenlétében. A sejtek feltárását ultrahangozással segítettük. A rekombináns proteineket TALON CellThru Resin (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Franciaország) módszert használva tisztítottuk a gyártó utasításait követve.

2.28. A CMV gB proteinjének előállítása

Vero sejteket fertőztünk a gB szekretált formáját kifejező vaccinia vírussal (1xMOI). A CMV gB proteint a felülúszóból tisztítottuk affinitás kromatográfiás módszerrel.

2.29. Lymphocyta proliferációs teszt

*C. muridarum*mal háromszor fertőzött BALB/c és C57BL/6N egerek lépét eltávolítottuk, és szitán eldörzsölve sejtszuszpenziót készítettünk belőlük, melyet tápfolyadékban 96-lyukas lemezbe mértünk, $5x10^5$ sejt/lyuk mennyiségben. Ezt követően 2 μg/ml pGP3 vagy pGP4 rekombináns proteint vagy tisztított, hőinaktivált *C. muridarum* EB-t (30 perc, 90 °C) [198]

illetve mock preparátumot adtunk a sejtekhez. Az antigénekre létrejött proliferációs választ MTT analízis segítségével detektáltuk (Boehringer Mannheim Biochemica, Mannheim, Németország), a kialakult színintenzitást ELISA leolvasó készülékkel mértük. A stimulációs indexeket a következő módon számoltuk: a rekombináns proteinekre, a mock valamint a hőinaktivált EB-kre kialakuló proliferáció által adott OD értéket elosztottuk a nem stimulált lépsejtek által adott OD-val.
Az LcrE proteinnel immunizált egerekben kialakult LcrE-specifikus celluláris válasz vizsgálatára hasonló lymphocyta proliferációs vizsgálatot végeztünk, ez esetben rekombináns LcrE proteinnel történt a stimulálás.

2.30. Western blot

A tisztított pGP3 és pGP4 proteineket valamint a *C. muridarum* EB-ket 5 percig főztük 4x Dual Color Protein Loading pufferben (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Németország), majd 2 μg proteint szeparáltunk 10%-os SDS poliakrilamid gélelektroforézis segítségével. A szétválasztott proteineket átvittük polyvinylidene difluoride membránra (SERVA, Heidelberg, Németország), majd a membránokat egy éjszakán át 4 °C-on, 5% tej, 0.05% Tween 20 (Sigma) tartalmú PBS-sel telítettük. A membránokat fertőzetlen, illetve *C. muridarum*mal 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.
A *C. pneumoniae* LcrE proteinjével végzett immunizációs kísérletünk során a rekombináns LcrE proteint, valamint a *C. pneumoniae* EB-ket szeparáltuk, majd blottoltuk a fent említett paraméterekkel, és telítést követően *C. pneumoniae*val oltott egerek és kontrollként naiv egerek savóival (a savókat 1:50 hígításban használtuk, a hígító 5% tej és 0.05% Tween20 tartalmú PBS) 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) (Sigma–Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Németország) és hidrogén-peroxidot tartalmazó 10 mM Tris (pH 7.5) pufferben detektáltuk.

2.31. Far Western blot analízis

A koncentrált *C. pneumoniae* EB-ket, valamint a mock készítményt hőkezeltük, majd SDS poliakrilamid gélelektroforézis során elválasztottuk, blottoltuk, majd a membránt 10 μg rekombináns MIG/CXCL9 (PeproTech, Hamburg, Németország) chemokin, BSA és Tween20 tartalmú pufferrel kezeltük. A mosást követően HRP-konjugált anti-MIG/CXCL9 (PeproTech) ellenanyaggal inkubáltuk. A kontrollként MIG/CXCL9 proteinnel nem kezelt EB-ket használtunk. Hasonló módon jártunk el a *C. trachomatis* növényi peptidekkel való kapcsolódásának kimutatása során. Ebben az esetben koncentrált *C. trachomatis* EB-kkel dolgoztunk, melyet a szeparálás és a blotolás után kezeltünk növényi peptidekkel. A mosást követően a membránokat HRP-konjugált anti-egér IgG-vel kezeltük. A kísérleteink során

kialakult immunológiai kötést DAB segítségével 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 molekulasúlyú proteint kivágtuk a gélből és tömegspektrometriás (liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MSMS)) vizsgálatra bocsátottuk.

2.32. A DNS immunizált egerekben kialakult CMV specifikus ellenanyagválasz kimutatása ELISA módszerrel

A gB-specifikus ellenanyag kimutatása az egér szérumokból immunaffinitással tisztított gB fehérjét használtunk 96-lyukas ELISA lemezeket kezelve a proteinnel (100 ng /lyuk), egy éjszakán át, 4°C-on. Ezt követően a lemezeket 1% tejet és 0.05% Tween 20-at tartalmazó PBS-sel blokkoltuk 1 órán át. Az egér szérumok és a másodlagos antitest hígítására 0.4% tejet és 0.05% Tween 20-at tartalmazó PBS-t használtunk. Szekunder antitestként torma-peroxidáz (HRP)-konjugált kecske anti-egér IgG $F(ab)_2$ (Cappel, Aurora, OH) ellenanyagot alkalmaztunk. Az enzimaktivitást jelző szubsztrát oldat H_2O_2-t és o-fenilén-diamint (OPD) tartalmazott, és a kialakult OD-t ELISA leolvasó segítségével értékeltük. A gB-specifikus ellenanyagszintet a minták OD-jával jellemeztük. A pp65-specifikus ELISA-ban a lemezek bevonására pRC-pp65 plazmiddal tranziensen transzfektált 293-sejtek, kontrollként transzfektálatlan 293 sejtek lizátumát használtunk. Minden egyes szérumhígításra a következő módon számoltuk ki a pp65-specifikus OD-t: a pp65 antigénen kapott OD-ből kivontuk a kontroll antigénen kapott OD értéket. Azoknak a mintáknak az OD-ját tekintettük pozitívnak, melynek az OD-ja nagyobb vagy egyenlő volt, mint 8 immunizálás előtti egér szérumának átlag OD-ja (+2xSD). A gB-re specifikus IgG alosztályok mérésére is ELISA módszert alkalmaztunk tisztított gB proteint használva antigénként, másodlagos ellenanyagként peroxidáz-konjugált patkány monoklonális anti-egér IgG1 és IgG2a-t (BioSource, International, Camarillo, CA) alkalmaztunk. Az antigén-specifikus IgG alosztályok meghatározására szérumban egy standard görbét készítettünk tisztított egér IgG1 vagy IgG2a (Cappel) antigén és a másodlagos ellenanyagok olyan hígításait alkalmazva, mely hasonló OD-t eredményezett mindkettő esetén. A HRP-konjugált IgG1-et 1:175 és a HRP-vel konjugált IgG2a-t 1:8000 hígításban használtuk. Az IgG1 tartalmat a szérum 1:1350-es az IgG2a tartalmát viszont a szérum 1:50-es hígításában mértük.

2.33. A DNS immunizált egerek CMV specifikus neutralizációs képességének vizsgálata mikroneutralizációs módszerrel

A szérumok HCMV neutralizáló aktivitását a korábban leírtak szerint végeztük [199]. Röviden, lapos aljú 96-lyukú lemezen inkubáltuk a szérumok felező léptékű hígításait 4000 PFU/lyuk HCMV (Towne törzs) és tengerimalac komplement (Bio-Whittaker) jelenlétében 1 órán át CO_2 inkubátorban. Ezt követően hozzáadtuk a szuszpenzióban lévő MRC-5 sejteket (1,5–2 × 10^4/lyuk). 48–72 órás inkubálás után a neutralizáló titert úgy határoztuk meg, mint a legmagasabb szérumhígítás reciproka, mely citopátiás hatást (CPE) még nem mutatott. Kontrollként immunizálás előtti szérumok szolgáltak, melyek esetében a CPE 90-100% volt.

2.34. A DNS immunizált egerek CMV antigén specifikus citotoxikus T-lymphocyta (CTL) aktivitásának mérése ^{51}Cr felszabadulási teszttel

A pp65-specifikus CTL tesztet a korábban leírtak szerint végeztük [200]. Röviden: az immunizált egerek lépsejtjeit *in vitro* 5 napig stimuláltuk 24-lyukú lemezekben rekombináns HCMV-pp65-t expresszáló vaccinia vírussal fertőzött (VacWR-pp65, MOI=1) autológ lépsejtekkel (effektor:stimulátor (E:T) arány=2:1). A nem kitapadó lépsejtek citolitikus aktivitását ^{51}Cr felszabadulási teszt segítségével mértük. Targetsejtként az MHC azonos P815, és a nem azonos MC57 sejtkultúrákat alkalmaztuk, amelyeket VacWR-pp65-tel vagy a parenterális VacWR vírussal fertőztük. A specifikus ^{51}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 ^{51}Cr felszabadulás >10% volt.

2.35. A kísérletek során alkalmazott molekuláris módszerek

2.35.1. Teljes RNS kivonás a fertőzött egerek tüdejéből, qPCR

Az IL-17 cytokin gének vizsgálatára fertőzött és kontroll egerek tüdejéből TRI reagens segítségével teljes RNS kivonást végeztünk. A kapott mintákat DNase 1 (Sigma) 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 (Invitrogen Carlsbad, CA, USA), 20 pmol random hexamer primert használtunk 20 μl pufferben. A qPCR-rek során a hígított cDNS-t használtuk specifikus primerek (10 pmol/μl) és SYBR® Green JumpStart™ Taq ReadyMix™ (Sigma) jelenlétében. A méréseket LightCycler® 2.0 készülék (Roche Applied Science) segítségével végeztük. A ciklus egy 10 perces 95 °C-os denaturációs lépéssel indult, ezt követte 40 ciklus (paraméterei: 5 mp 95 °C-on, 20 mp 60 °C-on és 25 mp 72 °C-on). Kísérleteink során különböző primereket használtunk: IL-17A F: 5’-AAG GCA GCA GCG ATC ATC C-3’ és R: 5’-GGA ACG GTT GAG GTA GTC TGA G-3’; IL-17C F: 5’-TGC TGA GGA ATT ATC TCA CGG CCA-3’ és R: 5’-ACT GTG TTC CAG CTA GAG GTC CTT-3’; IL-17D F: 5’-CAA GCA CAT CAC ACA CAT CCC GTT-3’ és R: 5’-TTA GTA AGC TTG GGC CAC AGG AGA-3’; IL-17E (IL-25) F 5’-CAG GTG TAC CAT CAC CTT GCC AAT-3’ és R: 5’-ACA ACA GCA TCC TCT AGC AGC ACA-3’; IL-17F F: 5’-AGC AAG AAA TCC TGG TCC TTC GGA-3’ és R: 5’-CTT GAC ACA GGT GCA GCC AAC TTT-3’. Az IL-23 p19 esetében a primerek: F: 5’-CCT GCT TGA CTC TGA CAT CTT C-3’ és R: 5’-TGG GCA TCT GTT GGG TCT C-3’, a β-aktin esetén: F: 5’-TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAA C-3’ és R: 5’-TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG TCC G-3’.
További kísérletünkben az egér MIG/CXCL9 és egyéb CXCL chemokin specifikus primerek a következők voltak: MIG/CXCL9 F: 5’-ACG TAG GTT TCG AGA CCA GGG ATT-3’ és R: 5’-CAA CAC CAA GTG TTC TGC CAC CAA-3’; IP10/CXCL10 F: 5’-TGG CTA GTC CTA ATT GCC CTT GGT-3’ és R: 5’-TCA GGA CCA TGG CTT GAC CAT CAT-3’; ITAC/CXCL11 F: 5’-TAC CCG AGT AAC AGC TGC GAC AAA-3’ és R: 5’-TAT GAG GCG AGC TTG CTT GGA TCT-3’.
A *C. muridarum* plazmidján kifejeződő géneket a következő primerekkel detektáltuk: TCA01 F: 5’-GCT TCG GAG CGC AAT GAC AAC TAA-’3 és R: 5’-ACA GAA GAG TTC CCG CCA GAA CAA-3’;

TCA02 F: 5’-AGA GCG TGC ATG AAC TTC TGA GGA-3’ és R: 5’-ACT ATG CTG CAA GGA GGT AAG CGT-3’; TCA03 F: 5’-TGG GAA GAG CTG TTA AGA AGG CGT-3’ és R: 5’-CGT ATG CGA AAT AGG CCT GAG CTT-3’; TCA04 F: 5’-ACT TGG GAC ATC GAC AAC TCC TGT-3’ és R: 5’-CCA TCA AAG ATT TGG TCG CCA AGC-3’; TCA05 F: 5’-CAC CCT TAG AAC TCT ACC ACA AGA G-3’ és R: 5’-TCT AGA CAG AAT AAG CAT AAT CAA CGC T-3’; TCA06 F: 5’-AGC ATC GAA GGC AAC CAT AAA GGC-3’ és R: 5’-AAC AGC CGT AAA TTG CTG CTT GGG-3’; TCA07 F: 5’-ACA ACA CGT GCT CCT TCT TGG AGA-3’ és R: 5’-AGC CAA CGC ATT ATA GGC GGA TGA-3’. A *C. muridarum* 16s rRNS amplifikálására használt primer pár: F: 5’-CAT GCA TAT GAC CGC GGC AGA AAT-3’ és R: 5’-ACC CTA AGT GCT GGC AAC TAA CGA-3’. A kísérletben használt primereket az Integrated DNA Technologies Inc. (Montreal, QC, Canada) szintetizálta.

A ciklus áttörési pont (Ct) meghatározása a Roche Molecular Biochemicals LightCycler Software version 3.5 automatizált küszöbérték analízisével történt. A legalacsonyabb ciklus számot, amelyben a különböző transzkriptumok detektálhatóvá váltak, fogadtuk el Ct-nek és ezt hasonlítottuk a β-aktinéhoz, a kettő közötti különbség adta a ΔCt értéket. A relatív expressziós szintet, mint $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ adtuk meg, ahol a ΔΔCt=a vizsgált minta ΔCt értékéből kivonva a kontroll minta ΔCt értéke. Meghatároztunk a küszöbértéket, és azokat a változásokat tekintettük szignifikánsnak, ahol az expresszió mértékének növekedése meghaladta a kétszerest a kontrollhoz képest.

2.35.2. 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 kit (Promega) segítségével. Az *ompA* gén kimutatása nested PCR analízissel történt, az *ompA* gént GeneAmp 2700 PCR System (Applied Biosystems) segítségével amplifikáltuk korábban leírt előírásokat követve [103]. A valós idejű PCR vizsgálatok LightCycler real-time PCR system (Roche) használatával történtek *C. pneumoniae groEL-1*-specifikus nested primerek és LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I kit (Roche) alkalmazásával. A primereket a DNA Lasergene program (DNASTAR,Inc) és BLAST segítségével terveztük, külső primerek: F1: 5’-TGA TTA AAA GAG GGC GTC CAG ATT-3’ és R1: 5’-CAG GCG ACG GAA CTA CAA CAG C-3’, a belső primerek: F2: 5’-ACG CAT TCT TGA GTT TCT GAA TT-3’ és R2: 5’-AAA GCC GTA AAA GTT GTT GTT GAT-3’. Standard görbét a külső primerek segítségével amplifikált termék 10-es léptékű hígításával készítettünk ($2x10^8$–$2x10^{-1}$ kópia/µl). Az összes reakciót 3 párhuzamossal végeztük. A ciklusok során a következő paramétereket használtuk: denaturáció 95 °C 10 min; 50 ciklus 95 °C 2 s, 57 °C 6 s, 72 °C 14 s végül 7 °C. A kimutathatóság határa $6.7x10^2$ kópia/ml volt. Minden mintában meghatároztuk a relatív chlamydia genom mennyiségét. Az álfertőzött egerek tüdejét *in vitro* kezeltük *C. pneumoniae*val az inokulációs dózisnak megfelelő mennyiséggel, melyben a kópiaszám $1.2x10^9$/ml volt.

2.35.3. A chlamydia DNS kvantitatív meghatározása HeLa229 és Caco-2 sejtekben

A chlamydia szaporodás mennyiségi mérésére az általunk korábban leírt direkt kvantitatív PCR módszert alkalmaztuk [186]. A 96- vagy 24-lyukas lemezeken tenyésztett sejteket chlamydiaval fertőztük, 0, 24, 48 és 72 óra elteltével a fertőzött sejteket (3 párhuzamos lyukban) kétszer mostuk a lemezekben PBS-sel. Ezután 100 vagy 625 µl Milli-Q vizet adtunk a lyukakhoz és a lemezt -80 °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 (BioRad, Hercules, CA, USA) alkalmazásával. A chlamydia genomot *pyk* primer pár segítségével detektáltuk: *pyk* F: 5'-GTT GCC AAC GCC ATT TAC GAT GGA-3' és R: 5'-TGC ATG TAC AGG ATG GGC TCC TAA-3'.

2.35.4. RNS kivonás és qRT-PCR chlamydia fertőzött HeLa229 és Caco-2 sejtekből

A génexpresszió detektására 6-lyukas lemezekben tenyésztett fertőzött sejtekből 2, 24, 48 vagy 72 órával teljes RNS-t vontunk ki GenElute Mammalian Total RNS Miniprep készlet segítségével (Sigma). Az extrahált RNS-t DNáz I-gyel (Sigma) kezeltük. A cDNS-t DNáz-kezelt RNS-ből szintetizáltuk qScript cDNA Supermix kit segítségével (Quanta Biosciences, Gaithersburg, MD, USA). A cDNS-t templátként használva qRT-PCR végeztünk PerfeCTa SYBR Green Supermix segítségével (Quanta) CFX96 Real Time C1000 Thermal Cycler készülékben (Bio-Rad). Belső standardként a *16S rRNS*-t használtuk a chlamydia gének relatív expressziójának meghatározására [201]. A *C. trachomatis euo, groEL, ftsK, omcB, ompA* és *pyk* gének transzkripciójának relatív expresszióját mértük. A primereket az Integrated DNA Technologies Inc. (Montreal, Quebec, Kanada) szintetizálta.

C. trachomatis célgén	Sorrend	PCR termék mérete (bp)
16S rRNS F	5'-CAC AAG CAG TGG AGC ATG TGG TTT-3'	191
16S rRNS R	5'-ACT AAC GAT AAG GGT TGC GCT CGT-3'	
euo F	5'-TCC CCG ACG CTC TCC TTT CA-3'	263
euo R	5'-CTC GTC AGG CTA TCT ATG TTG CT-3'	
ftsK F	5′ CGG AAG AAA GCA AGC GTT TC 3′	70
ftsK R	5′ GGG CTA GAT ACA CGC ATG TTT TAA C 3′	
groEL F	5'-TCA CTC TAG GGC CTA AAG GAC G-3'	115
groEL R	5'-TCA TGT TTG TCG GCA AGC TC-3'	
omcB F	5′ TGA AGC AGA GTT CGT ACG CAG TG 3′	179
omcB R	5′ AAC GGA TCT CTG GAC AAG CGC AT 3′	
ompA F	5′-TCG ACG GAA TTC TGT GGG AAG GTT-3′	171
ompA R	5'-TAT CAG TTG TAG GCT TGG CAC CCA-3'	

A mintákat három párhuzamosban teszteltük, és minden esetben minta nélküli desztillált víz kontrollt használtunk. Az amplifikáció specifikusságának igazolására olvadási görbe elemzést végeztünk. A relatív génexpressziós szinteket a ΔΔCt érték kiszámításával adtuk meg.

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

Az RNS extrahálására az egerekből a *C. pneumoniae* fertőzést követően a megadott időpontokban összegyűjtöttük az aorta sinusokat és azokat azonnal folyékony nitrogénben lefagyasztottuk. Kontrollként fertőzetlen egerek hasonló mintáit dolgoztuk fel. Az összekevert aorta mintákból teljes RNS kivonást végeztünk (Nucleospin RNA XS kit, Macherey-Nagel GmbH, Düren, Németország). A komplementer DNS-t (cDNS) 1 µg DNáz-zal kezelt RNS-ből szintetizáltuk qScript cDNA Supermix szintézis kittel (Quanta Biosciences, Gaithersburg, MD, USA). A qRT-PCR-t a cDNS templát és PerfeCTa SYBR Green Supermix (Quanta) felhasználásával végeztük, melynek során a chlamydia *16S rRNS* és egér *β-aktin* szekvenciákat amplifikáltuk. Az RT-PCR-hez használt primerek szekvenciái a következők voltak: *C. pneumoniae 16S rRNS* F: 5'-GGC GAA GGC GCT TTT CTA A-3' és R: 5'-CCA GGG TAT CTA ATC CTG TTT GCT-3' [202]; egér *β-aktin* F: 5'-TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAA-3' és R: 5'-TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG TCC G-3' [203]. Az amplifikáció specifitását olvadási görbe elemzéssel igazoltuk. Az amplifikáció érzékenységét a korábbiakban ismertetett standard alkalmazásával kontrolláltuk [204]. A kópiaszámot a következő képlet segítségével számítottuk ki: kópiaszám/µl=[6.022 × 10^{23} (molekulák/mol) × DNS koncentráció (g/µl)]/(bázisok párok száma × 660 dalton); a standard görbét az amplikon tízszeres sorozatos hígításaiból készítettük (1000 000-ról 1 példányra). qPCR hígítási sorozat elemzése azt mutatta, hogy módszerünk érzékenységi küszöbértéke tíz *16S rRNS* kópia volt.

2.35.6. 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 steril eszközök használatával. Az egyes minták felét -70°C-on tároltuk nPCR elemzéshez; a másik felét 3% glutáraldehidben fixáltuk TEM és szövettani vizsgálat céljából. A kontroll mintaként, 4 nem szklerotikus artéria cerebri media szolgált, melyeket balesetben elhunyt áldozatokból nyertünk, akik a vizsgálatok idején hunytak el (31–40 év). A DNS-t fagyasztott mintákból extraháltuk High Pure PCR Template Preparation Kitet (Boehringer-Roche) használva a gyártó utasításai szerint. Az esetekből és a kontrollokból származó mintákat vakon teszteltük *C. pneumoniae* DNS kimutatására GeneAmp 2400 PCR (Perkin-Elmer) alkalmazásával *C. pneumoniae ompA* génre specifikus nPCR primer párok felhasználásával [205], amely 206 bp-os fragmenst eredményezett. A DNS intaktságát mindegyik mintában humán *β-aktin* génre specifikus primerek felhasználásával ellenőriztük. *C. pneumoniae*val (TWAR törzs) fertőzött McCoy sejtek lizátumából kivont DNS-t használtunk pozitív kontrollként. A *C. pneumoniae* primerekkel amplifikált DNS mintákat az ABI Prism DNS Sequencing Ready Detection Kit (Perkin-Elmer) segítségével szekvenáltattuk.

2.35.7. cDNA könyvtár készítés és szekvenálás

A *C. muridarum*mal fertőzött egerek tüdejéből a kivont RNS-t a génkifejeződés tanulmányozására további vizsgálatra küldtük. Az UD-GenoMed Kft a Debreceni Egyetem

Genomikus Gyógyszer és Bioinformatikai Alapkezelő Intézetével végezte a könyvtár készítést, a szekvenálást és az adatok elemzését. Az expresszált gének széleskörű, funkcionális elemzését a Voronto szoftverrel végeztük [206].

2.35.8. Az IDO1 és IDO2 RNS-Seq adatok qPCR validálása

A *C. muridarum*mal fertőzött egerek tüdejéből a kivont RNS-t reverz transzkripció során Maxima reverz transzkriptáz segítségével írtuk át, random hexamer primert alkalmazva (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). A qPCR vizsgálatokra Bio-Rad CFX96 készüléket használtunk. A qPCR-t SsoFast EvaGreen qPCR Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) mastermix és az egér specifikus primer párok segítségével végeztük, melyek a következők voltak: *IDO1* F: 5'-GCT TCT TCC TCG TCT CTC TAT TG-3' és R: 5'-TC TCC AGA CTG GTA GCT ATG T-3'; I*DO2* F: 5'-CCT GGA CTG CAG ATT CCT AAA G-3' és R: 5'-CCA AGT TCC TGG ATA CCT CAA C-3'; *β-aktin* F: 5'-TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAA C-3' és R: 5'-TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG TCC G-3'. Az amplifikációs specificitás ellenőrzése céljából qPCR-t olvadásgörbe elemzést végeztünk. A Ct értékeket kiszámítottuk az *IDO1*, *IDO2* és *β-aktin* génekre és a normalizált gén expressziókat ΔCt módszerrel számoltuk [207].

2.35.9. C. muridarum és C. trachomatis fertőzött epithel sejtek DNS chip és quantitatív PCR analízise

Egér epithel sejtkultúrát (BM12.4) fertőztünk *C. muridarum* vagy *C. trachomatis* L2 törzsekkel 1xMOI-val, 20 U/ml IFN-γ-t tartalmazó tápfolyadékban. Kontrollként IFN-γ mentes, de fertőzött sejtkultúrát, valamint mock fertőzést is alkalmaztunk. A celluláris RNS-t a fertőzést követő 24 órát követően Trizol (Invitrogen) segítségével vontuk ki és RNeasy mini kittel tisztítottuk (Qiagen). Az RNS integritását gélelektroforézissel ellenőriztük. A teljes RNS amplifikációja az Eberwine RNS amplifikációs protokollt követte, eukarióta target preparáló előírást használva (Affymetrix). Az amplifikált biotin jelölt RNS-t hibridizáltattuk Affymetrix Mouse 430A teljes genom DNS chipre. Az adatok analízisét a direkt párok összehasonlításával végeztük Affymetrix MicroArray Suite (MAS) programot (version 5.0; Affymetrix) használva, ahogyan már korábban leírásra került [208]. A szignifikánsan up- és downregulálódó gének láthatóvá tételére, a szignál intenzitásokat normalizáltuk, és a vizualizálásra TIGR MultiExperiment Viewer programot használtunk [209]. A szignifikánsan változott géneket a DAVID Web-based Gene Ontology analízist alkalmazva funkcionálisan csoportosítottuk [210]. A Pathway Studio program (version 6.0; Ariadne), valamint a STRING Web-based program segítségével végeztük az útvonal és hálózatanalíziseket [211]. Az eredmények validálására ugyanazt az RNS preparátumot használtuk kvantitatív PCR (qPCR) vizsgálatra, melyet a DNS chip analízis során alkalmaztunk. A validálás során a korábban leírt qPCR körülményeket és primereket használtuk [53].

2.36. Humán kísérletek

2.36.1. A C. pneumoniae és cardiovasculáris betegségek közötti kapcsolat

Az akut ischaemiás stroke (AIS) és a *C. pneumoniae* szerostátusz közötti összefüggés vizsgálatára 59, egymás után érkező, stroke-os beteget válogattunk be a tanulmányunkba a Szegedi Tudományegyetem, Neurológiai Klinikájának beteganyagából. A betegek átlagéletkora 52.8 év volt (32-65 év) 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 megtörténnie; 4) az életkor <65 év. Az AIS diagnózisa az újonnan kialakult fokális neurológiai jelek valamint vizsgálatok (komputer tomográfia, mágneses rezonancia képalkotás, elektrokardiográfia és echokardiográfia) alapján történt. A korábbról ismert myocardiális infarctus, pitvarfibrilláció, szívbillentyű károsodás illetve szívizombetegség fennállása tartozott a kizáró kritériumok közé. A kontroll csoportba 52 beteg került (átlagéletkor: 50.4 év, tartomány: 22-76 év), akik ebben az időszakban nyertek felvételt az osztályra, de nem volt AIS-uk. A kontroll betegek hátfájás (spondylarthrosis, ischias szindróma, discus degeneráció) vagy polyneuropathia miatt kerültek kórházba. A vérmintát a tünet kezdete után egy héten belül gyűjtöttük. A szérumok specifikus ellenanyag tartalmát a következő ELISA kitek segítségével határoztuk meg: HSV-1 és 2 IgG (ETI-HSVK-G 1/2; Diasorin); HSV-1 IgA (EIAgene; Adaltis); CMV IgM és IgG (Enzygnost, Dade Behring); EBV IgG (Captia EBV VCA (P18); Trinity); HHV-6 IgG (EIA; Biotrin); és *C. pneumoniae* IgM, IgG and IgA (NovaTec Immundiagnostica).

2.36.2. A HCMV specifikus CTL aktivitás vizsgálata véradókban

A 34 egészséges véradó beválogatása részben a Wistar Intézetben (Philadelphia, PA), valamint az SZTE-n történt. A tanulmányba bevont egyének CMV szerostátuszát mikroneutralizációs teszttel, valamit az általunk kifejlesztett házi ELISA teszttel mértük. A donorok HLA tipizálását komplement dependens citotoxicitással vagy PCR módszerrel a Szegedi Vértranszfúziós Állomás végezte.

A véradó donorok perifériás sejtjeinek transzformálása

A CTL teszthez szükséges target sejtek előállítására a véradókból izolált lymphoid sejteket EBV-t tartalmazó B95.8 sejt felülúszójával kezeltük. A 2-3 hét alatt transzformálódott lymphoblastokat 15% FBS-t tartalmazó RPMI-ben tartottuk fenn, majd kellő számú sejtet nyerve lefagyasztottuk és – 80°C-on tároltuk azokat felhasználásig.

A CTL teszt

A véradók vérmintáiból a PBMC-ket Ficoll grádiensen történő centrifugálással nyertük. A tesztek során friss, illetve fagyasztott sejtekkel is dolgoztunk, miután meggyőződtünk arról, hogy a sejtek citotoxikus képességét a fagyasztás nem befolyásolja. 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”

sejtpopulációt (a stimulátor responder arány 1:5 volt). A sejteket ezt követően 24-lyukas tenyésztőedénybe helyeztük és IL-2 valamint IL-7 jelenlétében inkubáltuk 8-13 napig. A target sejtként használt különböző számú lymphoblastokat (donorok lymphocytájából EBV-vel előzetesen transzformálva) vaccinia rekombinánsokkal (CMV géneket hordozó) fertőztük (MOI:1) 16 órán át, majd megmostuk és 100 μCi $Na^{51}CrO_4$-tal jelöltük (Amersham, Arlington Heights, IL) további 1 órán át. 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 használtunk nemcsak autológ HLA-1 azonos, hanem eltérő HLA típusú, heterológ targeteket is. A radioaktív króm felszabadulást Cobra II Packard Instrument (Meriden, CT) segítségével mértük. A százalékos fajlagos lízist a következőképpen határoztuk meg: 100x(kísérleti mintából mért felszabadulás-spontán felszabadulás)/(maximális felszabadulás-spontán felszabadulás). Az effektor sejtek CTL aktivitását akkor tekintettük pozitívnak, ha a tesztelt minták százalékos fajlagos lízise > 10%-kal tért el a háttér lízistől.

Memória CTL prekurzor frekvenciájának meghatározása véghígításos módszerrel

A frissen izolált, változó számú effektor PBMC-ket 30 egymást követő mélyedésbe mértük 96-lyukas lemezbe és együtt inkubáltuk γ-besugárzott (3000 rad, MKA 68A; Shepherd, Glendale, CA) autológ EBV-vel transzformált Vac-pp65-tel vagy Vac-IE1-exon4-gyel fertőzött lymphoblastokkal ($4x10^3$/lyuk stimulátor) autológ PBMC-ket használva „feeder" sejtekként ($6x 10^4$/lyuk). 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.

A CTL-ek fenotípusának meghatározása

Az CTL teszt fejezetben említett módon effektor sejtkultúrát nyertünk a PBMC-k kezelésével. Ezen 8-13 napig inkubált effektor sejteket használtunk a depléciós eljárás során. A sejtek egy részét anti-CD4, a másik részét anti-CD8 ellenanyaggal, illetve a harmadik részét mindkét ellenanyaggal (Caltag Lab, Burlingame, CA) kezeltük tengerimalac komplement (Accurate, Westbury, NY) jelenlétében 37°C-on, 45 percig. A mosást követően 4 órás króm felszabadulási tesztben vizsgáltuk a különböző fenotípusú sejtek CTL aktivitását, a fentebb leírt módon.

2.37. Statisztikai módszerek

A kapott adatok statisztikai elemzését SigmaPlot for Windows Version 11.0 vagy GraphPad Prism 8 vagy Rstudio program segítségével végeztük. Az adatok tulajdonságaitól függően Student's t-tesztet vagy Welch-próbát szükség esetén Wilcoxon-Mann-Whitney-próbát alkalmaztunk. Több, mint két csoport összehasonlítására variancia analízis (ANOVA) vizsgálatot Tukey post-hoc teszttel végeztük. A különbségeket akkor fogadtuk el szignifikánsnak, ha a $P<0.05$.

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-γ 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

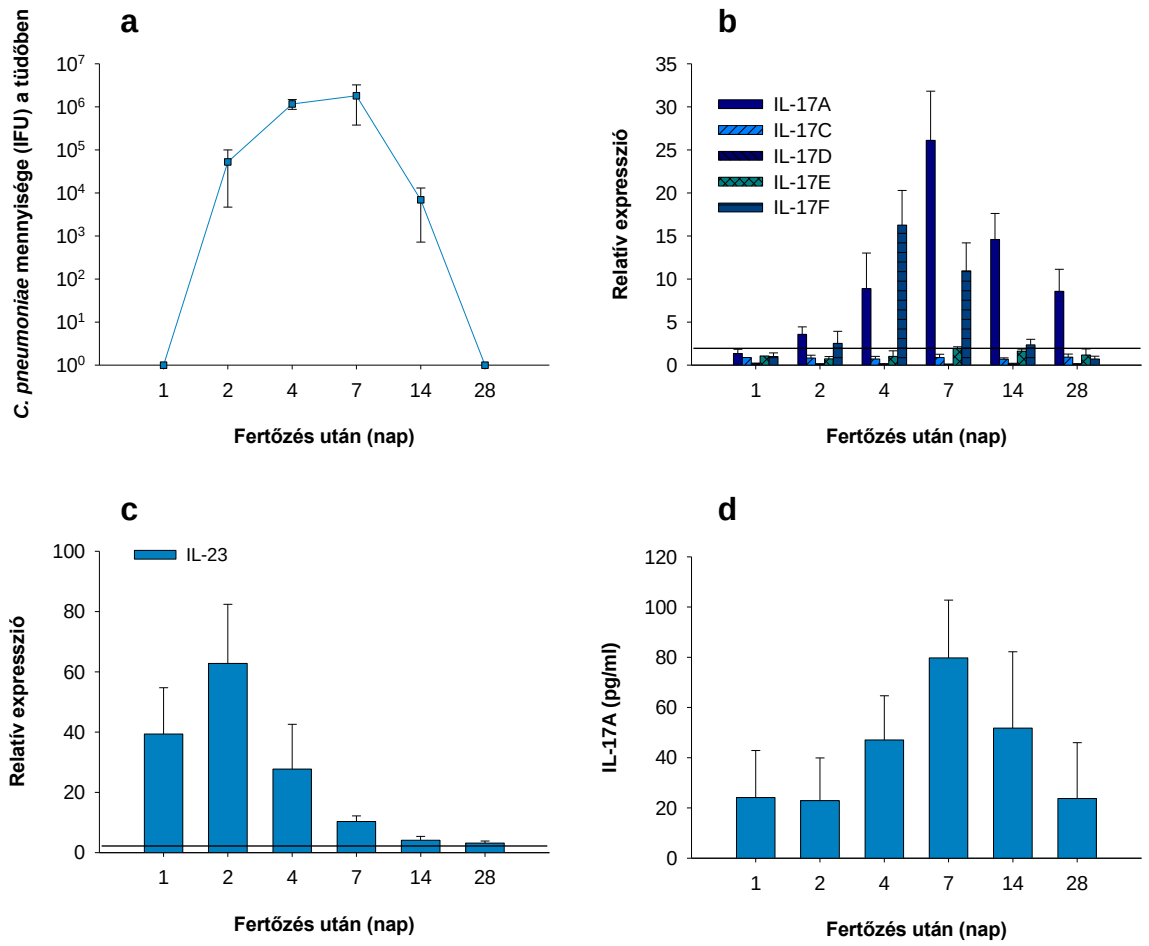
Ebben a témában az alábbi kérdésekre kerestük a választ

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?
4. Hogyan változik az IL-17A és IL-17E gének expressziója a reinfekciók során?
5. Indukálja-e a *C. muridarum* az IL-17E expresszióját a primer és a szekunder fertőzést követően?
6. Milyen sejtek tehetők 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 az ismételt fertőzések során?
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 járulhatnak ahhoz, hogy a *C. trachomatis* túlélhessen a gastrointestinális traktusban?

A C. pneumoniae fertőzés hatása az IL-17 család kifejeződésére BALB/c egerekben

Annak tisztázására, hogy a különböző IL-17 cytokinek indukálódnak-e *C. pneumoniae* fertőzés során és milyen szereppel bírnak a kórokozó elleni immunválaszban BALB/c egereket fertőztünk intranasálisan *C. pneumoniae*val. A fertőzést követő 1., 2., 4., 7., 14. és 28. napokon az egerek egy-egy csoportját feláldoztuk, és a tüdejüket feldolgoztuk: egy részéből teljes RNS-t vontunk ki a különböző IL-17 cytokinek, IL-23 mRNS-ének kimutatására, a másik részből cytokin meghatározást és visszatenyésztést végeztünk. A visszatenyészthető chlamydia mennyisége a fertőzést követő különböző időpontokban hasonlított a korábbi vizsgálataink eredményéhez [83], **(2a ábra)**. Az IL-17A mRNS expressziója már az első naptól megindult, de a csúcspontját a fertőzés legmagasabb szintjén, a 7. napon érte el, az expresszió 26.1-szeres volt a kontrollhoz képest. Ezt követően a kifejeződése folyamatosan csökkent, de még a fertőzést követő 28. napon is emelkedett volt (8.57-szeres), amikor már élő chlamydiát nem tudtunk kimutatni **(2b ábra)**. Az IL-17 családba tartozó IL-17A-hoz a leginkább hasonló IL-17F kifejeződése egy kicsit eltért az IL-17A-jétól, az expressziója a 4. napon tetőzött (16.25-szeres) ezt követően csökkent. Az IL-17C, az IL-17D és IL-17E expressziója nem változott az egyszeri *C.*

pneumoniae fertőzést követően az egerek tüdejében. Az IL-17A legfontosabb inducerének, az IL-23-nak az mRNS expressziója már az első napon megemelkedett és a legmagasabb kifejeződését (62.0-szeres) a 2. napon mutatta **(2c ábra)**. Az IL-17A cytokin mennyisége a tüdőfelülúszóban az mRNS expresszióval korrelált, vagyis már a 2. napra megemelkedett, a legnagyobb mennyiségben viszont a 7. napon mértük **(2d ábra)**.

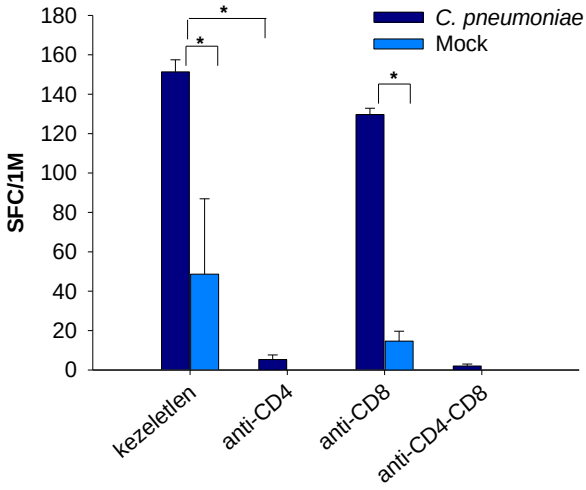


2. ábra. *A C. pneumoniae fertőzés hatása BALB/c egerek tüdejében.* ***a:*** *A fertőzött állatok tüdejéből visszatenyészthető C. pneumoniae mennyisége (IFU/tüdő).* ***b****: az oszlopok a fertőzött egerek tüdejében mért IL-17A, IL-17C, IL17D, IL-17E és IL-17F, valamint* ***c:*** *az IL-23 mRNS exresszióját mutatják. A tüdők teljes RNS tartalmát specifikus primereket használva RT-qPCR során vizsgáltuk. Az adatokat a 16S rRNS tartalomra normalizáltuk és a kontroll egerekben mért expresszióhoz viszonyítottuk. A vonal az általunk meghatározott szignifikancia küszöböt mutatja.* ***d****: A fertőzött egerek tüdejének IL-17A protein koncentrációja. Az oszlopok az adott időpontban hét egér mintáiban mért mennyiségek átlagát±SD-t jelölik.*

A perifériás IL-17A termelő sejtek fenotípusának meghatározása

ELISpot vizsgálatot végeztünk annak tisztázására, hogy milyen fenotípusú és számú perifériás sejtek képesek az IL-17A termelésére. A teszt során *C. pneumoniae*val fertőzött és nem fertőzött egerek deplécióval szelektált $CD4^+$ és $CD8^+$ lépsejtjeit használtuk. Az előzetes *C. pneumoniae* fertőzés szignifikánsan emelte az *in vitro C. pneumoniae*val restimulált perifériás IL-17A termelő sejtek számát. 24 órás proliferációt követően 150 IL-17A termelő sejtet mutattunk ki egy millió perifériás sejtből, míg a fertőzetlen egerekben ez a szám 2 volt az *in*

vitro C. pneumoniae restimulációt követően. Szignifikánsan több IL-17A termelő sejtet detektáltunk a *C. pneumoniae*val fertőzött és *C. pneumoniae* antigénnel kezelt lépsejtek között, mint a fertőzött, de *in vitro* mock kezelt lépsejtek között. A $CD8^+$ sejtek depléciója, így kizárása a rendszerből nem befolyásolta számottevően az IL-17A termelő sejtek számát. Ezzel ellenkezőleg, a $CD4^+$ sejtek eltávolítása az IL-17A-termelő sejtek számának szignifikáns csökkenéséhez vezetett az *in vitro* restimulált, és előzetesen *C. pneumoniae*val fertőzött egerek lépsejtjeiben **(3. ábra)**. Ez az eredmény arra utalt, hogy az IL-17A fő forrása a $CD4^+$ T-sejt a *C. pneumoniae*val fertőzött egerekben.



3. ábra. *C. pneumoniae fertőzött egerek IL-17A termelő sejtjeinek mennyisége és fenotípusa. Hét fertőzött egér összekevert lépsejtjeit depletáltuk anti-CD4 vagy anti-CD8 ellenanyaggal. Mágneses szeparálást követően in vitro restimuláltuk C. pneumoniaeval, valamint mock (álfertőzött) preparátummal. A stimulálódott IL-17A-t termelő sejtek számát ELISpot rendszerben vizsgáltuk. Az oszlopok az egy millió sejtre vonatkozó SFC szám átlagát (3 párhuzamos lyuk) ±SD-t jelölik.*P<0.05*

Az IL-17 A in vivo neutralizációjának hatása egerekben

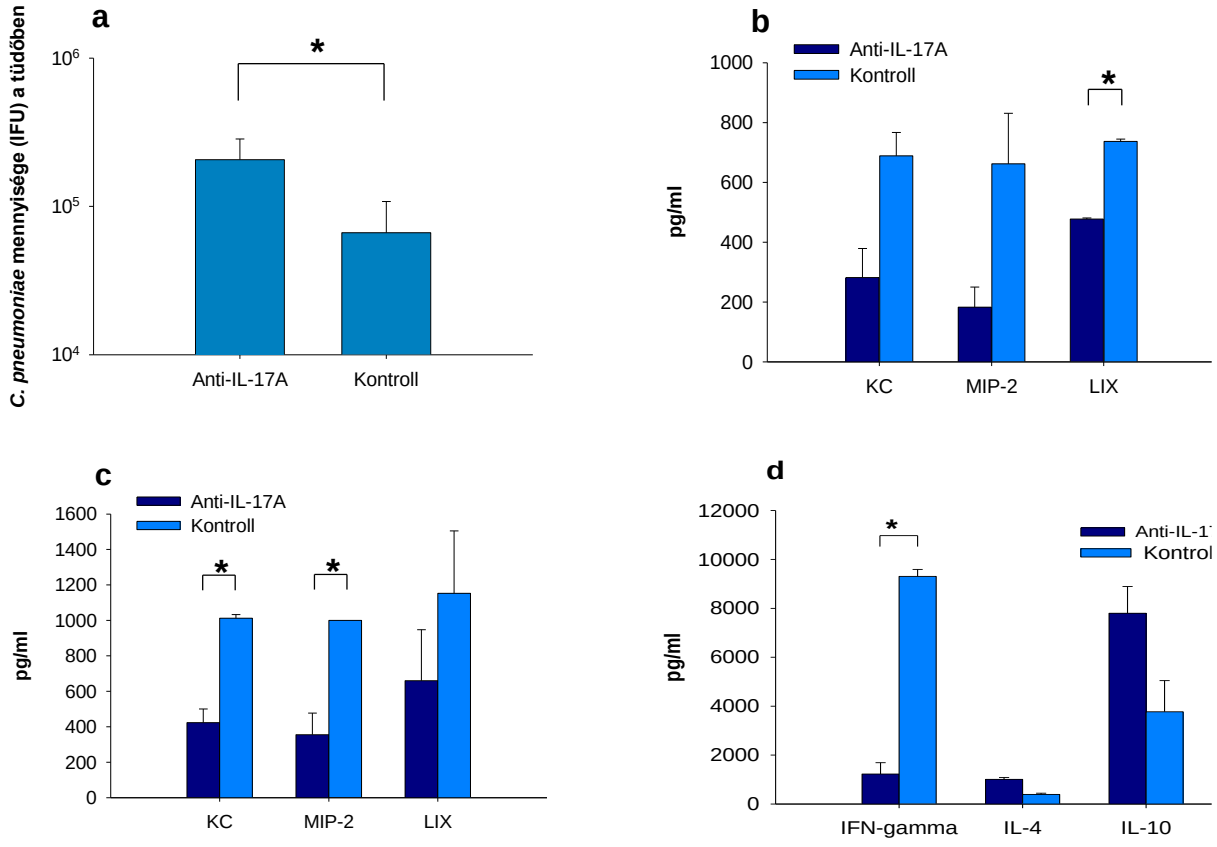
Munkánk során kíváncsiak voltuk arra, hogy mi lehet a szerepe az IL-17A-nak a *C. pneumoniae* fertőzés során, ezért a fertőzés előtt 24 órával, majd a fertőzést követően 20 és 48 órával az egereket anti-IL-17A monoklonális ellenanyaggal kezeltük, az IL-17A cytokin hatásának felfüggesztésére. Kontrollként izotípus kontroll ellenanyaggal oltottuk az egereket. Az állatokat a fertőzést követő 1. és 4. napon áldoztuk fel. A BAL-ból meghatároztuk a lymphocyták, macrophágok és neutrophil granulocyták számát. A tüdőhomogenizátumból visszatenyésztettük a *C. pneumoniae*t, valamint szendvics ELISA-val meghatároztuk különböző chemokinek szintjét. Az *in vivo* anti-IL-17A kezelés szignifikánsan csökkentette a BAL IL-17A mennyiségét az izotípus kontroll ellenanyaggal kezelt egerekéhez képest a negyedik napon (17.2 vs. 64.8 pg/ml). A neutrophil granulocyták száma a fertőzést követő 1. és 4. napon is szignifikánsan kevesebb volt, mint az izotípus kontroll ellenanyaggal kezeltekben. Az IL-17A neutralizációja nem befolyásolta a macrophágok és a lymphocyták számát a BAL folyadékban **(1. táblázat)**.

Fertőzés utáni napok	Kezelés	IL-17A (pg/ml)	Neutrophil (× 10^3/ml)	Macrophág (× 10^3/ml)	Lymphocyta (× 10^3/ml)
1	anti-IL-17A	22.6±1.1	2.2±0.15*	15±1.2	2.5±0.19
	izotípus ellananyag	48.2±2.3	212±7.1	22±1.1	2.7±0.3
4	anti-IL-17A	17.2±0.6*	1.5±0.12*	56±4.2	4.1±0.56
	izotípus ellenanyag	64.8±1.4	450±10.1	72±3.5	5.4±0.44

1. táblázat. *Az IL-17A mennyisége, valamint a különböző sejtek száma az anti-IL-17A vagy izotípus ellenanyaggal kezelt, majd C. pneumoniaeval fertőzött állatok BAL-jában. Az értékek az átlag±SD-t jelölik. *P<0.05*

A visszatenyészthető, élő chlamydia száma szignifikánsan magasabb volt az anti-IL-17A monoklonális ellenanyaggal kezelt csoportban a fertőzést követő 7. napon, mint az izotípus kontroll ellenanyaggal kezelt és fertőzött egerekben ($2.06x10^5$ IFU/ml vs. $6.69x10^4$ IFU/ml) **(4a ábra)**. A LIX protein mennyisége szignifikánsan alacsonyabb volt az anti-IL-17A-val kezelt egerek tüdő felülúszójában, mint a kontroll csoportban a fertőzést követő 1. napon **(4b ábra)**. A másik két vizsgált chemokin a KC és a MIP-2 mennyisége is szignifikánsan alacsonyabb volt a tüdőben az izotípus kontroll ellenanyaggal kezelt egerekben mérthez képest a 4. napon. **(4c ábra)**. A chemokinek csökkent mennyiségét a csökkent tüdő granulocyta számmal hoztuk kapcsolatba, mely az anti-IL-17A kezelés eredménye.

Arra is kíváncsiak voltunk, hogy vajon az IL-17A *in vivo* neutralizálása hogyan befolyásolja a Th1 és Th2 típusú választ, ezért ELISA módszerrel meghatároztuk az anti-IL-17A, illetve az izotípus ellenanyaggal kezelt, és később *C. pneumoniae*val fertőzött egerek IL-4, IL-10, IL-12 és IFN-γ cytokin szintjét a tüdőfelülúszókban. Az IFN-γ szint szignifikánsan alacsonyabb volt az anti-IL-17A ellenanyaggal kezelt csoportban, mint a kontrollban (1222.8 ± 465 vs. 9304.8 ± 287 pg/ml). IL-12 termelést a vizsgált napokban nem tudtunk detektálni, a Th2-es csoportba tartozó IL-4 és IL-10 tekintetében a szintek megemelkedtek, de nem volt szignifikáns eltérés a kontroll csoport cytokin szintjeihez képest **(4d ábra)**.

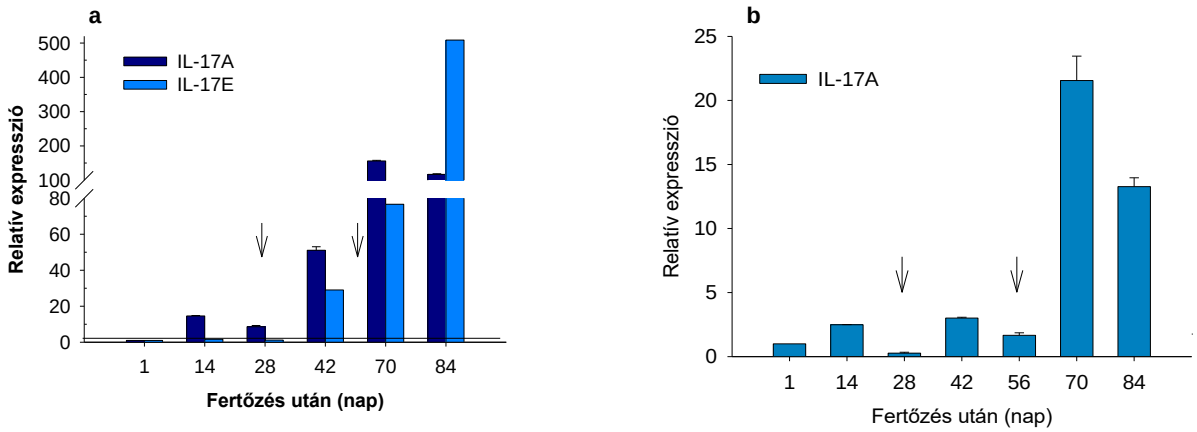


4. ábra. *Az IL-17A in vivo neutralizációjának hatása.* ***a*** *Az egereket in vivo kezeltük anti-IL-17A, valamint a kontroll csoportot izotípus ellenanyaggal. A 4. napon a visszatenyészthető C. pneumoniae mennyisége IF tesztben.* **b: (1. nap), c: (4. nap)***: a tüdők KC, MIP-2, LIX koncentrációja.* ***d:****a tüdők IFN-γ, IL-4 és IL-10 tartalma. Az oszlopok 7 egér tüdejében mért értékek átlagát±SD-t jelölik.*P<0.05*

Az ismételt fertőzés hatása a különböző IL-17 cytokinek expressziójára

Az irodalomból ismert az a tény, hogy a különböző fertőző ágensekkel történő reinfekciók szerepet játszhatnak krónikus légúti fertőzések (pl. asthma, COPD) pathogenezisében [212]. Emellett azt is leírták, hogy az IL-17E elősegítheti a proallergiás Th2-es immunválasz kialakulását [213]. Kísérletünkben ennek tanulmányozására BALB/c egereket fertőztünk *C. pneumoniae*val 3 alkalommal négy hetes időközönként, és minden fertőzés után 2 és 4 héttel az egerek egy csoportját feláldoztuk, hogy vizsgálhassuk az IL-17E mRNS kifejeződését. Az első fertőzést követően a visszatenyészthető *C. pneumoniae* mennyisége hasonló volt az előző kísérletünkhöz. A második és a harmadik fertőzést követően a vizsgált időpontokban nem tudtunk kimutatni élő chlamydiát az egerek tüdejéből. Az IL-17E expressziója az első inokulálást követően nem emelkedett meg, de a második és a harmadik fertőzést követően a kifejeződése drámaian nőtt, a fertőzést követő kései időszakban. Az IL-17E expressziója a 3. fertőzést követő 4. héten 400-szoros volt a kontrollhoz képest. Az IL-17E cytokin termelődésének kinetikája követte az mRNS kifejeződését. Az IL-17A mRNS kifejeződése is emelkedett volt, de nem számottevően, annak ellenére, hogy élő chlamydiát nem tudtunk

kimutatni a tüdő felülúszóból **(5a ábra)**. Abban az esetben, ha a kísérletet úgy változtattuk, hogy az egereket először fertőztük élő *C. pneumoniae*val, utána viszont hőinaktivált chlamydia inokulálásban részesültek, az IL-17A szintje megemelkedett az első és a második hőinaktivált chlamydia kezelést követően **(5b ábra)**. Az IL-17E expressziója viszont nem változott a hőinaktivált kezelés hatására. Nem változott az IL-17A és IL-17E expressziója az egerek azon csoportjában, melyben csak hőkezelt chlamydiával végeztünk inokulálást 3 alkalommal.



5. ábra. *Az ismételt C. pneumoniae fertőzés, valamint a hőinaktivált C. pneumoniae kezelés hatása az IL-17A és IL-17E mRNS expresszióra.* ***a:*** *az egereket a primer fertőzést követően 4 hetes időintervallummal még két alkalommal fertőztük.* ***b:*** *az egerek egy másik csoportját a primer fertőzés után két alkalommal hőinaktivált C. pneumoniaeval kezeltük. Az egereket a fertőzések, illetve a kezelések utáni 2 és 4 héttel feláldoztuk, tüdejükből teljes RNS-t vontunk ki, majd specifikus primereket használva megmértük a cytokin gének expresszióját. A kapott adatokat β-aktinra normalizáltuk és kontroll egerekben mért génkifejeződéshez viszonyítva ábrázoltuk. A vonal szignifikancia küszöböt mutatja. A nyíl a fertőzés/kezelés időpontját jelöli.*

Ellentétben az IL-17A pathogén hatásával az autoimmun betegségekben, az IL-17A fontos szerepet játszik a mucosális és epitheliális védelemben a különböző pathogének ellen, különösen a belekben és a bőr felszínen [214]. 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-23 mRNS expressziója megelőzte az IL-17A termelődését. Nemrégen megjelent egy tanulmány, amelyben beszámoltak arról, hogy egy másik chlamydia, a *C. muridarum* fokozta az IL-17A mRNS expressziót, valamint a Th17-kapcsolt cytokinek kifejeződését az egerek tüdejében, de az IL-17A mRNS expresszió kinetikája más volt, mint a mi kísérletünkben [124]. Az eltérés lehetséges oka, hogy más fertőző dózist, chlamydia fajt, illetve egérfajt használtak. Ezek mellett mások is azt találták, hogy a korai IL-17A termelés a pathogén dózisától függ, és szükséges hozzá a baktérium szaporodása [215][216].

Az IL-17A protektív szerepe a pathogének ellen irányuló immunválaszban meglehetősen ellentmondásos. *Mycobacterium* fertőzés esetén az IL-17A fontos szerepet játszik a gyulladásban és a granuloma kialakításában, de nem szükséges a védelemhez [217][218]. Az IL-17A különböző szerepét leírták *Salmonella* speciesek esetében is: az IL-17A nem szükséges

a *Salmonella (S). enterica* elleni védelemben, ezzel szemben a Th17-sejtek depléciója a belekből drámaian megemelte a *S. typhimurium* mennyiségét *Simian deficiencia vírus* fertőzés során majmokban [219][220]. Az IL-17A fontos szerepet játszik korai *Listeria monocytogenes (L. monocytogenes)* fertőzés során a májban, mivel IL-17A génkiütött egerekben csökkent protektív választ mértek [221]. *K. pneumoniae* fertőzés során az IL-17A túltermelése lokálisan a TNF-α, IL-1β és MIP-2 termeléshez vezetett, valamint fokozódott a polimorfonukleáris leukocyták vándorlása a gyulladás helyére, melyek aztán fokozott baktérium kiürüléshez és az egerek fokozott túléléséhez vezettek [116]. Kísérletünkben a $CD4^+$ lépsejtek depletálása drasztikusan csökkentette az IL-17A termelő sejtek számát ELISpot rendszerben vizsgálva, ami arra utalt, hogy főleg a $CD4^+$ sejtek felelősek az IL-17A termelésért *C. pneumoniae* fertőzést követően. A közlemények többsége szerint az IL-17A termelő sejtek főleg $CD4^+$ T-sejtek, de bizonyos intracelluláris pathogének esetén (*Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis* BCG, *L. monocytogenes*) a $\gamma\delta$ T-sejtek is fontos szerepet játszanak az IL-17A termelésében [221][222] [117]. Más sejttípusok, így az NK sejtek és a $CD8^+$ T-lymphocyták IL-17A termelését is leírták [223], de kísérletünkben a $CD8^+$ sejtek eltávolítása nem befolyásolta az IL-17A ELISpot módszerrel mért SFC számot. Irodalmi adatok alapján az IL-17A fokozza a neutrophil gyulladást a KC, LIX és MIP-2 termelésének indukálásával különböző sejttípusokban. Ennek megfelelően, ezen chemokinek jelenlétében fokozódik a neutrophil sejtek vándorlása a fertőzés helyére [224]. Kísérletünkben 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. Az IL-17A hasonló antibakteriális hatását mutatták ki az extracelluláris *K. pneumoniae* fertőzés során is [116]. Mások arról számoltak be, hogy az IL-17A-nak nincs direkt antimikrobiális hatása, mivel nem gátolta sem a *C. muridarum*, sem pedig a *C. trachomatis* L2 szaporodását L-929 sejtekben [216]. Ezen eredményt az előzetes kísérleteinkben mi is alátámasztottuk, ugyanis az előzetesen IL-17A-val kezelt *C. pneumoniae* visszatenyészthetősége nem csökkent a kezelés hatására. További fontos megfigyelésünk volt, hogy az IL-17A neutralizációja visszafogott intenzitású Th1-es választ eredményezett, amit a csökkent IFN-γ szint jelzett, valamint csökkentette, de nem szignifikáns módon a Th2-es cytokinek, mint pl. az IL-4 és az IL-10 szintjét.

A természetes úton történő primer, humán *C. trachomatis* fertőzés kialakít egyfajta immunitást, de nem teljeset, a chlamydia minimális szaporodást mutat a reinfekció során, viszont súlyos gyulladást indukál, ami később irreverzibilis szöveti károsodáshoz vezethet [225]. Ezzel összhangban a primer *C. pneumoniae* fertőzés részleges rezisztenciát biztosít a reinfekciókkal szemben egér modellben, de nem védi meg az állatokat a súlyos, gyulladásos szövődményektől [226]. Ezen megállapításoknak megfelelően az eredményeink azt sugallják, hogy az ismételt chlamydia fertőzések során a chlamydia antigén szintézise és kijutása az ismételten fertőzött mucosális epithel sejtekből vagy az alveoláris macrophágokból elhúzódó antigén stimulációt okoz, ami jelentősen fokozza a krónikus gyulladás kialakulását. 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*t már nem tudtunk kimutatni a tüdőben, ami arra utal, hogy az IL-17A-nak fontos szerepe van a krónikus gyulladásos folyamatokban. Ezen megfigyelések nagyon érdekesek annak tükrében, hogy olyan légúti pathogének, mint pl. a chlamydiák vagy a mycoplasmák által okozott reinfekcióknak szerepe lehet az asthmás tünetek aktiválásában. Ennek a folyamatnak a részletes, pontos pathomechanizmusát még kevéssé vizsgálták.

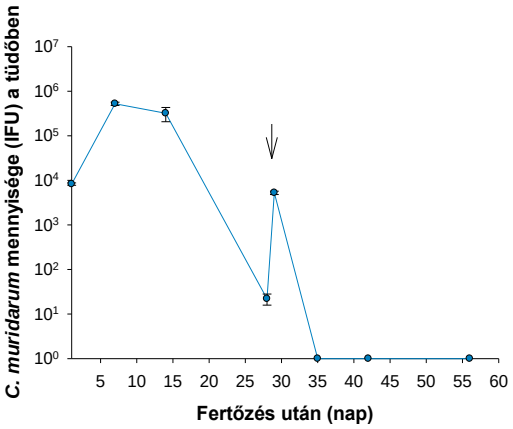
Egy publikációban beszámoltak arról, hogy a tüdő epithel sejtek transzgenikus IL-17E túltermeltetése emelkedett nyák produkcióhoz és légúti macrophág és eosinophil infiltrációhoz vezetett, míg az IL-17E gátlása csökkentette a légúti gyulladást és a Th2-es cytokinek termelését allergén indukálta asthma modellben [213]. Az általunk elvégzett kísérletek alapján élő pathogénre 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 pathogénnel kezeltük. Az IL-17A mRNS kifejeződése viszont fokozódott az élő chlamydiával történt fertőzés után, valamint abban az esetben is, ha azt inaktivált chlamydiával történt kezelés követte, ami arra utal, hogy az IL-17A jelátvitel beindításához elegendő a baktériumon jelenlevő pathogén asszociált mintázat, nem szükséges hozzá élő chlamydia.

Mmivel az IL-17 indirekt módon hozzájárul az anti-chlamydiás hatás kifejtéséhez, az eredményeink arra a lehetséges mellékhatásra hívják fel a figyelmet, hogy a különböző autoimmun eredetű kórképek kezelésében használatos monoklonális anti-IL-17 tartalmú szerek a fennálló chlamydia fertőzések súlyosbodását eredményezhetik.

A C. muridarum infekció és reinfekció indukálja az IL-17A és IL-17E mRNS kifejeződést az egerek tüdejében

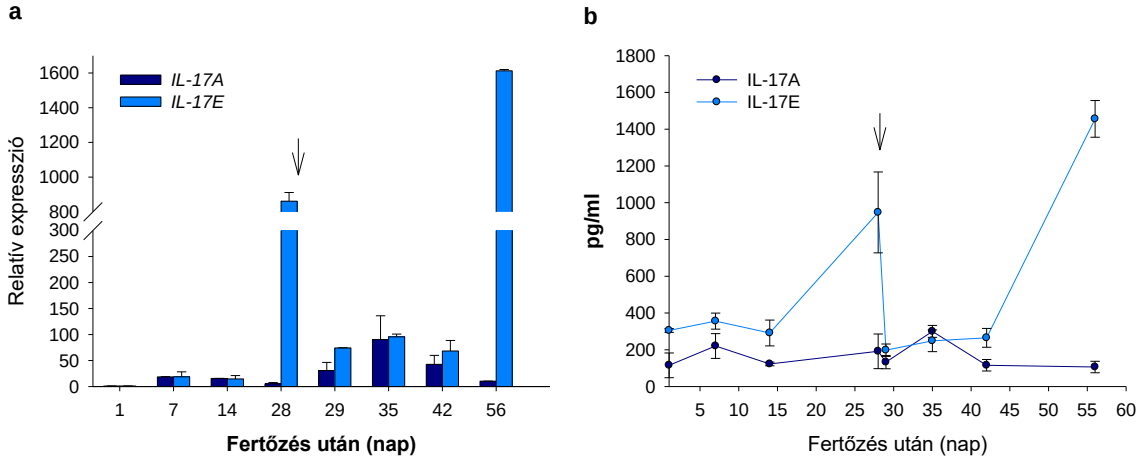
Annak tisztázására, hogy vajon az IL-17E termelés más faj, a *C. muridarum* esetében is a fertőzés kései szakaszában mutat fokozott kifejeződést, BALB/c egereket fertőztünk *C. muridarum*mal intranasálisan, és ezt követően a 28. napon ismételt fertőzést alkalmaztunk.

Az egerek mintáinak vizsgálata a fertőzést követő 1., 7., 14., 28., 29., 35., 42 és 56. napon történt. A visszatenyészthető chlamydia mennyisége a 7. napon érte el maximumot $5.23x10^5$ IFU/tüdő mennyiséggel, ezt követően lecsökkent $3x10^1$ IFU/tüdő a 28. napra. A reinfekció első napján a chlamydia titere $5.25x10^3$ IFU/tüdő volt, viszont a későbbi időpontokban élő chlamydiát nem tudtunk visszatenyészteni **(6. ábra)**.



6. ábra. *A visszatenyészthető C. muridarum mennyisége a fertőzést és az ismételt fertőzést követően. A fertőzött állatok tüdejéből visszatenyészthető C. muridarum mennyiséget indirekt IF tesztben határoztuk meg (IFU/tüdő). Az adatok minden időpontban 7 egérben mért C. muridarum IFU átlagát±SD-t jelölik. A nyíl az ismételt fertőzés időpontját mutatja.*

Az IL-17A mRNS expressziója a 7. napon 20-szoros volt a kontrollhoz képest, aztán folyamatosan csökkent. A reinfekciót követően hasonló kinetikát mutatott, mint a primer fertőzés után, de az expresszió magasabb volt, 30-, 90-, 40-szeres a 29., 35., 42. napokon **(7a ábra)**. Az IL-17A protein termelés kinetikája követte az mRNS expresszióját **(7b ábra)**, viszont az IL-17E expressziója erősen eltért ettől, a legmagasabb kifejeződést a 28. napon mértük (860-szorost). Az ismételt fertőzés utáni első napon az IL-17E expressziója alacsony szintre csökkent, de ezt követően fokozatosan emelkedett, a reinfekció 28. napján 1600-szoros volt, mely a kísérlet utolsó mintavétele volt **(7a ábra)**. Az IL-17E protein termelődése teljes mértékben követte az mRNS kifejeződést a primer és a reinfekció során is **(7b ábra)**.

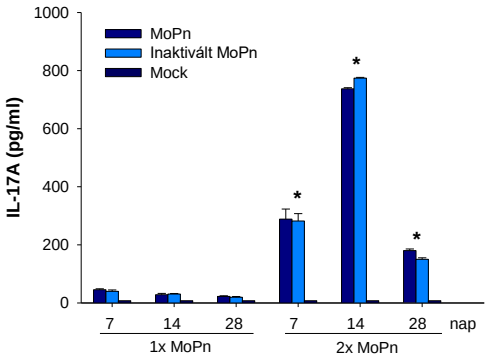


7. ábra. *Az ismételt C. muridarum fertőzés hatása az IL-17A és IL-17E expresszióra.* ***a:*** *Az egereket a primer fertőzést követően még egy alkalommal fertőztük. Az állatokat a fertőzés után különböző időpontokban feláldoztuk, tüdejükből teljes RNS-t vontunk ki, majd specifikus primereket használva megállapítottuk a cytokinek mRNS-ének az expresszióját. A kapott adatokat β-aktin expresszióra normalizáltuk és a kontroll egerekben mért génkifejeződéshez viszonyítva ábrázoltuk. Az oszlopok 7 egérben mért expresszió átlagot±SD-t jelölnek.* ***b*****:** *A*

fertőzött egerek tüdejéből az IL-17A és IL-17E cytokineket ELISA segítségével detektáltuk. A nyíl a második fertőzés időpontját mutatja.

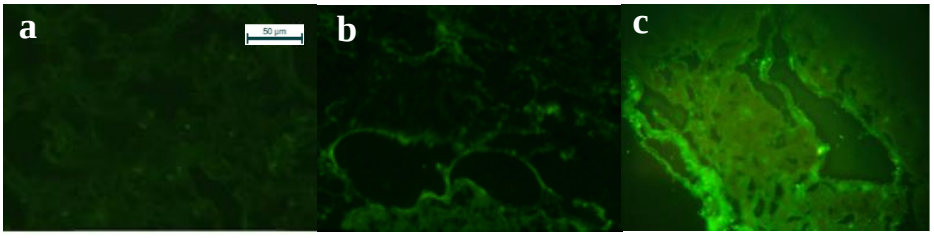
Az IL-17E termelése kompartmentalizált

Irodalmi adatok alapján tudjuk, hogy különböző sejtek, pl. T-lymphocyták, epithel sejtek képesek az IL-17E termelésére [227]. Azt viszont nem tudtuk, hogy mely sejteknek köszönhető az IL-17E termelés *C. muridarum* fertőzés során. A fertőzött egerek lépsejtjeivel lymphocyta proliferációs vizsgálatot végeztünk, hogy meggyőződjünk arról, hogy az *in vitro C. muridarum* stimulálás hatására képesek-e IL-17E termelésre. Nem tudtunk kimutatni IL-17E proteint, sem az élő, sem pedig az inaktivált chlamydia stimuláció hatására. Nem mutattak továbbá IL-17A termelést sem a fertőzetlen egerek lépsejtjei, valamint a kontrollként alkalmazott stimulálatlan sejtek sem. Ezzel szemben az egyszer és kétszer fertőzött egerek lépsejtjei, mind az élő, mind pedig a hőinaktivált chlamydia stimulációra IL-17A termeléssel reagáltak. Nem volt szignifikáns különbség az élő és inaktivált chlamydia által okozott IL-17A produkció között. Az egy alkalommal fertőzött egerek sejtjei kevesebb IL-17A-t termeltek, függetlenül az *in vitro* stimuláció típusától **(8. ábra)**.



8. ábra. *Fertőzött és ismételten fertőzött egerek lépsejtjeinek IL-17A termelése. Az egerek lépsejtjeit a fertőzést követő különböző időpontokban in vitro restimuláltuk élő vagy inaktivált C. muridarummal, majd a sejtek felülúszójából meghatároztuk az IL-17A mennyiséget ELISA módszerrel. Az oszlopok hét egér lépsejtjei által termelt cytokin mennyiségének átlagát ±SD-t mutatják. Szignifikánsan több IL-17A-t termeltek a kétszer fertőzött egerek lépsejtjei az egy alkalommal fertőzötthöz képest *P<0.05.*

Mivel a perifériás sejtek nem termeltek IL-17E-t, a fertőzött és újrafertőzött egerek tüdejéből metszeteket készítettünk és azokat IF festésnek vetettük alá, anti-IL-17E monoklonális ellenanyagot, majd FITC-jelölt anti-egér ellenanyagot használva. Nem volt látható fluoreszcencia a fertőzetlen egerek tüdejében **(9a ábra)**. IL-17E pozitivitást tapasztatunk viszont az egyszer és kétszer fertőzött és azt követően 4 héttel feláldozott egerek tüdejében. Az IL-17E pozitív sejtek a bronchusok epitheliális rétegében helyezkedtek el, csak néhány pozitív sejtet találtunk a tüdő intersticiumban **(9b,c ábra)**.



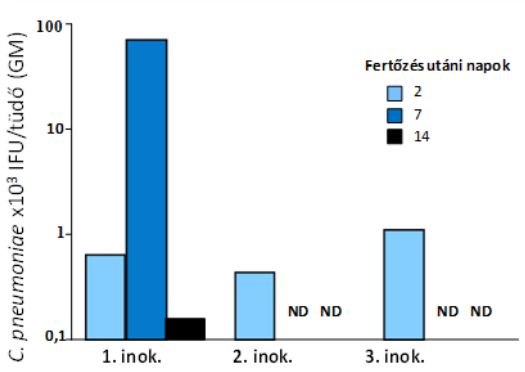
9. ábra. *Az IL-17E termelődése a fertőzetlen (**a**), a fertőzött (**b**) és az ismételten fertőzött (**c**) egerek tüdejében. A metszeteket IL-17E specifikus monoklonális ellenanyaggal majd FITC-jelölt anti-egér IgG ellenanyaggal kezeltük*.

A *C. muridarum*mal végzett kísérleteink összhangban vannak a *C. pneumoniae* által kiváltott válasz vizsgálati eredményeivel. Az IL-17A termelő sejteknek fontos szerepük lehet a légúti mikroorganizmusok ellen kialakult immunválaszban. A szerepét az is alátámaszthatja, hogy a pathogénnel történt ismételt fertőzés során a perifériás sejtek több IL-17A-t termeltek **(8. ábra).** 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. Nagyon érdekes, hogy az ismételt fertőzés hatására az IL-17E génexpressziója és fehérjeszintézise is hirtelen lecsökkent **(7a,b ábra).** Úgy gondoljuk, hogy a fertőzés hatására képződő, Th1-es cytokinek közé tartozó IFN-γ gátolhatta az IL-17E expresszióját a korai *C. muridarum* reinfekció során. Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy nem a perifériás sejtek a felelősek az IL-17E termelődéséért a megfertőzött egerekben (ellentétben az IL-17A-val), ami azt sugallta, hogy az IL-17E termelés kompartmentalizált, az IL-17E termelő sejteket a tüdőben találtuk meg. Ezt az eredményünket a mások által találtak is alátámasztották, a T-sejtek, hízósejtek és más haemopoeticus sejtek IL-17E termelése nem volt fontos a Th2-típusú/eosinophil légúti gyulladás kialakulásában, ami arra utalt, hogy az IL-17E termelődésében nem immun eredetű sejtek játszanak szerepet [227].
Kísérletünk összegzéseként elmondhatjuk, hogy eredményeink arra engednek következtetni, hogy a *C. pneumoniae* reinfekciók kiválthatják az IL-17E termelődését, mely a Th2-es cytokinek indukálásával az asthmás folyamatok kialakításában vehet részt. Így a reinfekcióknak indirekt szerepe lehet az asthma tüneteinek kialakulásában.

Az élő chlamydia, a bakteriális DNS kimutatása a tüdőben, vérben és a lépben az ismételt C. pneumoniae fertőzést követően

Korábban már leírták, hogy a *C. pneumoniae* a primer fertőzést követően a 17. napig, míg szekunder infekció esetén a 8. napig tenyészthető vissza a BALB/c egerek tüdejéből [198]. *C. pneumoniae* DNS-t kimutattak tüdőből, perifériás mononukleáris sejtekből más egértörzsekben [228][189]. Az ember élete során akár többször is megfertőződhet *C. pneumoniae*val, a reinfekciókat követő immunológiai változások viszont nem tisztázottak. Nem állt rendelkezésre információ arról sem, hogy a fertőzést és az ismételt fertőzést követően mennyi ideig mutatható ki a bakteriális DNS a vérben, valamint arról sem, hogy milyen kópiaszámban van jelen a *C. pneumoniae* a tüdőben és a vérben. Ennek tisztázására BALB/c egereket oltottunk *C. pneumoniae*val vagy mock preparátummal. Az első fertőzést még két másik követte 8 hetes időközönként. A látható szimptómák sokkal enyhébbek voltak és rövidebb ideig tartottak a második fertőzést követően, és teljesen hiányoztak a harmadik infekciót követően. Valamennyi egér felépült a betegségből. A *C. pneumoniae* titere a 7. napon volt a legmagasabb [geometriai átlag (GM) 6.9×10^4 IFU/tüdő]. A baktérium száma a 2. napon mindkét reinfekciót követően hasonló volt, mint a primer fertőzés utáni 2. napon, de a

szignifikáns védelem egyértelmű jele volt, hogy a pathogén a 7. napra kiürült az egerek tüdejéből **(10. ábra)**.



10. ábra. *Az egerek tüdejéből visszatenyészthető C. pneumoniae mennyisége 1, 2 és 3 inokulációt/fertőzést követően. Az oszlopok 3-5 egér tüdőhomogenizátumában mért C. pneumoniae titer geometriai átlagát (GM) jelölik. ND: nem detektálható.*

A primer fertőzés után a *C. pneumoniae* DNS-t sikeresen amplifikáltuk *ompA* specifikus primereket használva nPCR segítségével a 2. naptól 4 hétig a tüdőkből, a PCR pozitív egerek száma a 8. héten kezdett csökkenni. A második és harmadik fertőzést követően a PCR pozitivitás gyakorisága már a 2. héttől csökkenést mutatott az egerek tüdejében **(2. táblázat).** Azért, hogy bizonyíthassuk a *C. pneumoniae* genom jelenlétét és mennyiségét a mintákban, meghatároztuk a chlamydia *groEL-1* gén számát – mely csak egy kópiában van jelen a *C. pneumoniae* genomjában – real-time PCR vizsgálattal azon mintákban, melyek a nPCR tesztben pozitívnak bizonyultak **(2. táblázat)**. A hetedik napon a genom ekvivalens gén száma 100-szor magasabb volt a primer fertőzést követően, és 100-szor alacsonyabb a második és harmadik oltást követően, az első nappal összehasonlítva. A bakteriális genom viszont $5x10^2$–$7.8x10^3$ mennyiségben még kimutatható volt a 25 állatból 14-ben a fertőzést követő 4-8 héttel is az állatok tüdejében. Az egerek vérében a *C. pneumoniae* DNS-t nPCR segítségével teszteltük, mely alapján azt találtuk, hogy már a fertőzést követő 1. és 2. napon megjelent a vérben függetlenül attól, hogy első vagy második reinfekció állt fenn. Az összes egér vérmintája 1 héttel a primer fertőzés után pozitív volt nPCR vizsgálattal, a második fertőzést követő 1. és 2. napon ugyancsak pozitivitást tapasztaltunk az összes egér esetében; a harmadik inokulálást követően az 1. és 2. napon csak egy egér volt nPCR-pozitív a háromból. Két héttel az első fertőzést követően öt egérből kettő volt nPCR pozitív, a reinfekcióknál az arány ötből egy volt. A vérben a maximális kópiaszám hasonló volt mindhárom fertőzést követően ($1x10^4$ – $4x10^4$/ml) **(2. táblázat)**. A bakteriális DNS a tüdőkből a 10. hétre kiürült általában, azonban az 5 egérből 1 tüdeje PCR pozitív maradt 24 héttel a primer fertőzést követően, valamint a 21 tüdőből 2 volt pozitív a 20. és a 33. héten a harmadik inokulációt követően, a kópiaszám $2x10^3$-$3x10^3$/ml volt a tüdőszuszpenzióban. Néhány egérben reinfekció hiányában is detektálható volt a *C. pneumoniae* DNS a vérben, későbbi időpontokban: a vizsgált 18 állatból 3 hordozott *C. pneumoniae* DNS-t 10, 18 és 49 héttel a fertőzést követően $1x10^3$-$5.5x10^4$/ml kópiaszámban, demonstrálva, hogy az állatok kis hányada a vérében sokáig hordozza a

baktériumot. A *C. pneumoniae* DNS-t sikeresen amplifikáltunk időnként az egerek lépéből a betegség akut szakaszában.

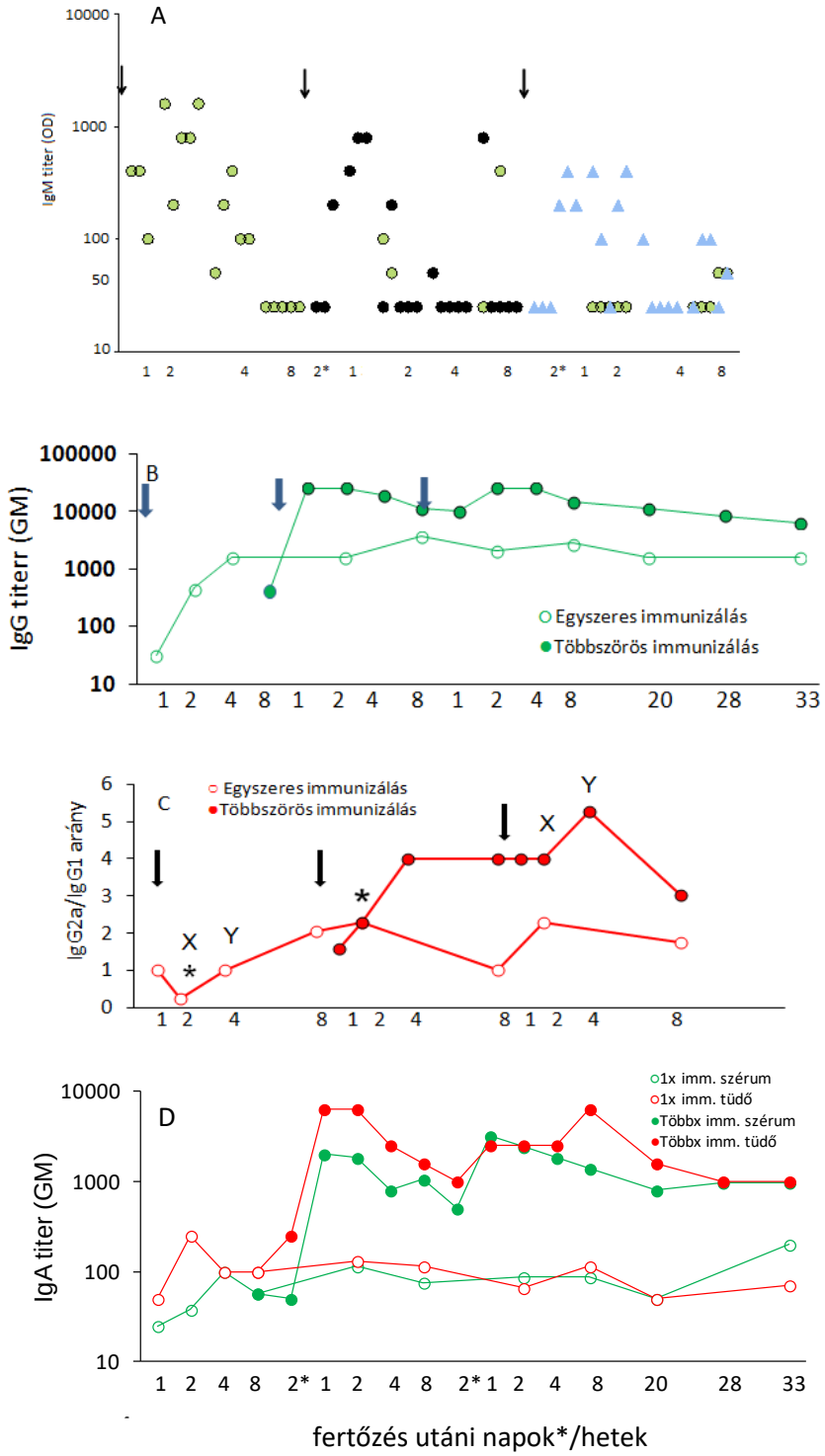
Fertőzés utáni idő	Fertőzések száma					
	1		2		3	
	tüdő	vér	tüdő	vér	tüdő	vér
1 nap	(2+/3) $3.8x10^7$ $\pm2.1x10^7$	(1+/3) $<6.7x10^2$	(3+/3) $5.4x10^6$ $\pm3.2x10^6$	(0+/3)	(3+/3) $5.6x10^6$ $\pm4.0x10^6$	(1+/3) $7.0x10^3$
2 nap	(3+/3) $1.7x10^9$ $\pm5.6x10^8$	(2+/3) $4.3x10^3$ $\pm2.7x10^3$	(3+/3) $6,3x10^7$ $\pm5.5x10^7$	(3+/3) $1.0x10^4$ $\pm8.2x10^3$	(3+/3) $1.6x10^7$ $\pm1.2x10^7$	(1+/3) $1.0x10^4$
1 hét	(3+/3) $3.8x10^9$ $\pm2.0x10^9$	(3+/3) $<6.7x10^2$	(3+/3) $5.6x10^4$ $\pm5.4x10^4$	(0+/3)	(3+/3) $7.6x10^4$ $\pm7.1x10^4$	(0+/3)
2 hét	(5+/5) $1.5x10^7$ $\pm9.2x10^6$	(2+/5) $2.8x10^4$ $\pm2.4x10^4$	(4+/5) $1.8x10^3$ $\pm1.0x10^3$	(1+/5) $<6.7x10^2$	(3/5) $1.2x10^3$ $\pm1.0x10^3$	(1+/5) $4.0x10^4$
4 hét	(5+/5) $3.8x10^3$ $\pm1.2x10^3$	(0+/5)	(1+/5) $5.0x10^2$	(0+/5)	(3+/5) $2.2x10^3$ $\pm3.8x10^3$	(0+/5)
8 hét	(4+/5) $7.8x10^3$ $\pm8.9x10^3$	(0+/5)	(1+/5) $1.0x10^3$	(0+/5)	N.D.	(0+/5)

2. táblázat. *Az ompA specifikus nPCR vizsgálattal pozitív tüdők és vérminták száma/az összes vizsgált minta száma. A genom ekvivalensek számát groEL-1 specifikus real-time PCR vizsgálattal nyertük. A számok az nPCR vizsgálattal pozitív egerek 1 ml tüdő vagy vérmintájának C. pneumoniae kromoszóma kópiaszámát ±SD jelölik*.

A C. pneumoniae specifikus IgM, IgG és IgA ellenanyagok szintje, IgG2a/IgG1 arány alakulása az ismételt fertőzés során

A *C. pneumoniae* specifikus IgM, IgG és IgA ellenanyagok termelődésének kinetikája még nem került leírásra korábban, és az sem tisztázták, hogy miképp változik az IgG2a/IgG1 arány ismételt fertőzések során. Ennek megválaszolására nyomon követtük a humorális immunválaszt a primer és a reinfekciók során az immunglobulin izotípusok és annak altípusai tekintetében. A *C. pneumoniae* specifikus IgM ellenanyagot az egerek szérumában a fertőzés után 1 héttel tudtunk kimutatni, mely a maximumát a 2. héten érte el (**11A ábra)**. Az IgM termelődése a 8. héten elérte a kimutathatóság határát az egerek nagy részében. A második és a harmadik inokulációt követően az összes egérben kimutattuk az IgM ellenanyag termelést a fertőzés után 1 héttel. Néhány egérben szignifikánsan magasabb IgM szintet mértünk későbbi időpontokban, még azok között is, melyek csak egy inokulálásban részesültek. A primer fertőzés során az IgG-t a fertőzést követő 2. héttől detektáltuk, ezt követően az IgG termelődése perzisztált a vizsgálat végéig, a 49. hétig **(11B ábra)**. A második fertőzés az IgG titer gyors és szignifikáns emelkedését idézte elő, mely aztán a második fertőzést követő 8.

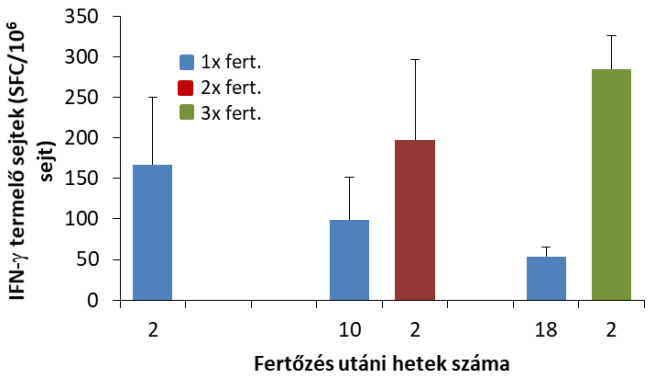
hétre lecsökkent. A harmadik fertőzés a második fertőzés utáni szintre emelte az IgG produkciót, ezt követően az IgG titer lassan csökkent, de magas maradt. Az egér szérumok IgG altípus összetételének vizsgálatára meghatároztuk a *C. pneumoniae* specifikus szérum IgG1 és IgG2a szintet és a két altípus titeréből hányadost számoltunk. Az IgG1 titer geometriai átlaga hasonló vagy magasabb volt a primer fertőzést követő 1-4. hétig, de a későbbiekben ez megváltozott, az IgG2a titere magasabb lett, mint az IgG1 titere. Az IgG2a/IgG1 arány relatíve stabil maradt a 24 hetes megfigyelés alatt; az arány 1 és 2 között mozgott. Mind az IgG1, mind pedig az IgG2a válasz fokozhatónak (boosterelhető) bizonyult az ismételt fertőzések során, de az IgG2a szint magasabb volt, így az IgG2a/IgG1 arány is magasabb lett **(11C ábra)**. A szérum IgA az első fertőzés után nagyon alacsony titerben volt jelen, de a legtöbb egy alkalommal inokulált egér szérumában a specifikus IgA még a 33. héten is jelen volt. A második fertőzés az IgA titer gyors emelkedését idézte elő; egy héten belül elérte a maximális szintjét, ezt követően csökkent az újabb fertőzésig. A harmadik fertőzés után az IgA szint emelkedett és magas maradt (a titer geometriai átlaga: 1000) a vizsgált időpontig **(11D ábra)**. A szérum immunglobulin szintek mellett elemeztük a tüdő homogenizátumban is a *C. pneumoniae* specifikus IgA ellenanyag szintet **(11D ábra)**. A tüdőben indukálódó IgA ellenanyagok termelődési kinetikája korrelált a szérum ellenanyagok kinetikájával.



11. ábra *C. pneumoniae specifikus ellenanyagok egy, illetve többszörös inokulációt követően.* ***A:*** *A szérum IgM tartalma a fertőzést követő különböző időpontokban. Jelek: zöld kör: 1-szer fertőzött, fekete kör 2-szer fertőzött, kék háromszög 3-szor fertőzött egerek.* ***B:*** *A szérumok IgG tartalma.* ***C:*** *Egyszer vagy többször fertőzött egerek szérumának IgG2a és IgG1 titerének aránya. Szignifikáns különbséget kaptunk az arányok között két héttel a fertőzést követően az egyszer és kétszer oltott egerek mintáiban *P=0.033, az 1 és 3 alkalommal oltott egerek két hetes mintáiban x P=0.016, valamint 4 hetes mintákban Y P=0.008.* ***D:*** *A C. pneumoniae specifikus IgA titerek geometriai átlaga egyszer és többször fertőzött egerek szérumában és tüdejében különböző időpontokban. A * a fertőzés után eltelt napot jelöli. A nyíl a fertőzések időpontját mutatja.*

A lépsejtek IFN-γ termelése a C. pneumoniae fertőzést követően

A szisztémás IFN-γ termelést, mely az adaptív celluláris immunválaszról nyújt felvilágosítást, az IFN-γ termelő sejtek számszerű mérésével határoztuk meg; a sejteket *in vitro* restimulálva *C. pneumoniae*val, majd ELISpot rendszert alkalmazva detektáltuk az IFN-γ termelő sejtek számát **(12. ábra)**. Két héttel az első oltást követően az IFN-γ termelő sejtek már jelen voltak a lépben. Az IFN-γ-t termelő SFC-k átlaga egy millió sejtre vetítve 167 volt, ami lecsökkent 99-re és 54-re a 10. és a 18. héten. Az ismételt fertőzés növelte a SFC (az átlag: 198) számot a második hétre, de ez a szám hasonló volt, mint az első inokuláció után. A harmadik fertőzés szintén megemelte a SFC számot, ami elérte a 285-öt a fertőzés utáni második hétre, ez az emelkedés sem eredményezett szignifikáns különbséget.



12. ábra. *Az 1, 2, 3 alkalommal C. pneumoniaeval fertőzött egerek lépsejtjeinek IFN-γ termelése in vitro C. pneumoniae stimulációra. Az egyszer fertőzött egerek lépsejtjeinek IFN-γ termelő képességét a fertőzést követő 2, 10 és 18 héttel, a kétszer, illetve háromszor fertőzött egerek lépsejtjeit az utolsó fertőzést követően 2 héttel vizsgáltuk ELISpot rendszerben Az oszlopok az átlagos SFC/10⁶ lépsejtet jelölnek.*

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 pathogén és a bakteriális DNS kimutatásával [198][229]. Az általunk kidolgozott egér modellben a két hónapos 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 [230]. Az általunk használt viszonylag alacsony *C. pneumoniae* dózis sokkal közelebb állt a természetes humán fertőzések dózisához, mint a más kutatók által használt nagyobb dózis [231][232][233]. Modellünkben, hasonlóan ahogy korábban beszámoltak róla [198][234], 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. A legtöbb *C. pneumoniae* okozta fertőzés felnőttekben reinfekció, és az újrafertőződött betegeknek enyhébbek a tünetei, mint a primer fertőzést követően [235], bár idősebb emberekben súlyosabb ismételt fertőzések is előfordulhatnak [236]. 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. 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, ismételt fertőzések követően, elsőként számoltunk be.

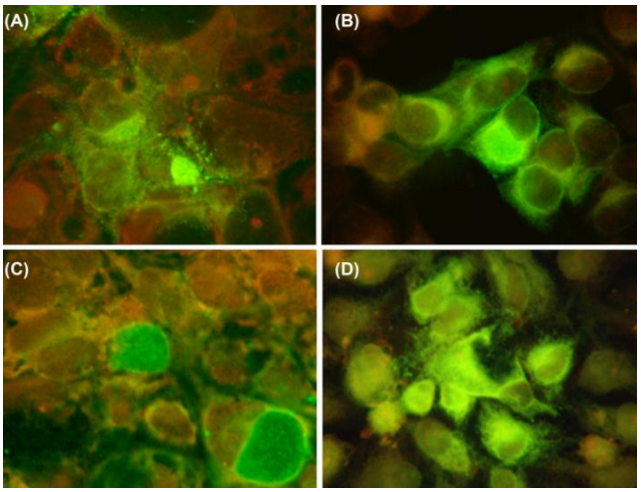
A legtöbb tanulmányban, melyben *C. pneumoniae* egér modellt alkalmaztak, nem sikerült IgM ellenanyagot kimutatni a szérumból, vagy csak a primer fertőzés utáni korai időszakban, a reinfekciók után mikroimmunfluoreszcens módszert használva pedig egyáltalán nem került detektálásra [226][237][238]. Az általunk kifejlesztett ELISA módszerrel az IgM ellenanyagot könnyedén ki tudtuk mutatni, ami azt sugallja, hogy az IgM jelenléte az éppen folyamatban levő fertőzés markere, függetlenül attól, hogy az primer vagy szekunder. Az irodalomban leírásra került, hogy a közösségben szerzett pneumoniában szenvedők egy csoportjában a fennálló fertőzés diagnózisát a jelenlevő IgM adja [239], ami egybehangzik az általunk találtakkal, miszerint az IgM ellenanyagok jelen vannak az akut és az ismételt fertőzések során is. Eredményeink alapján az ismételt fertőzések emelik az IgG2a/IgG1 arányt és elnyújtják a magas IgG2a szintet, ami a Th1-es típusú celluláris immunválaszra utal az ismételt fertőzéseket követően. Az Ig izotípus profil meghatározása a humán szérumban akár segíthet azonosítani azt, hogy a betegnek primer fertőzése vagy reinfekciója van-e. Korábbi közlemények azt sugallták, hogy az IgA ellenanyagok, mint egyfajta marker szolgálhatnak akut vagy krónikus *C. pneumoniae* fertőzésben [240]. 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, vérükben vagy a lépükben. Ezzel egybevágóan emelkedett IgA szintet és magas IgG titert találtak stroke-os betegekben [241], valamint kapcsolatot véltek felfedezni a magas IgA szint és a szimptómás carotis atheroscleroticus betegség között, bár a magas IgA szint nem korrelált a *C. pneumoniae* DNS jelenlétével a plakkokban [242]. Jó korrelációt találtunk a légzőrendszerben, valamint a vérben mért IgA szintek között, ahogy azt leírták már korábban köpet és szérum minták esetében [243]. Bár helyi antigén stimulus szükséges a magas IgA szint fenntartásához, az IgA szint még akkor is magas volt a tüdőben, amikor már az egerek többsége nem is hordozott *C. pneumoniae*t a tüdejében.

Az antigén stimulusra kialakuló IFN-γ termelő sejtek száma a gazdaszervezet celluláris immunreaktivitásáról ad információt. Primer *C. pneumoniae* fertőzés során kialakult T-sejt mediálta immunválaszt kimutattak korábban IFN-γ ELISpot módszer segítségével [229]. Kísérletünkben ezen felül 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-γ termelő sejtet, mint a primer fertőzés. Eredményeink fontosak lehetnek a *C. pneumoniae*

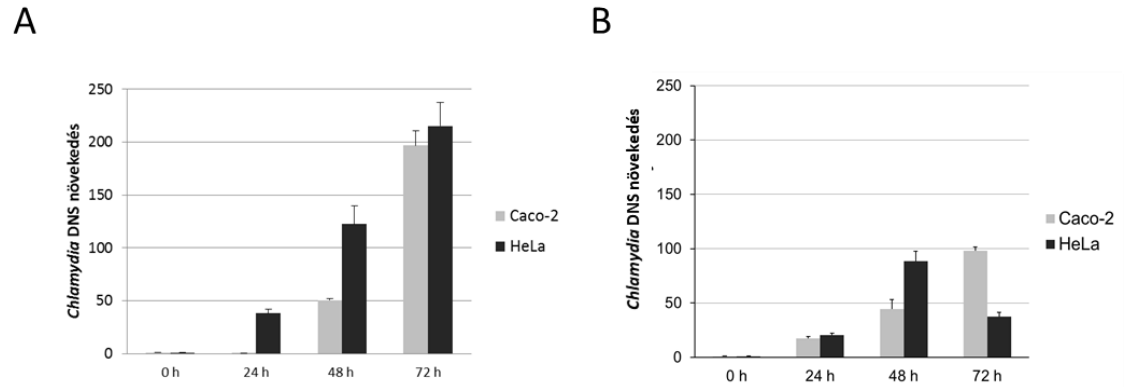
okozta többszöri fertőzés és annak következtében kialakuló gyulladásos folyamatok tisztázásában.

A chlamydia növekedése és a genom akkumulációja bél eredetű Caco-2 és permisszív gazdasejtekben

Annak kiderítésére, hogy vajon a gastrointestinális rendszer alkalmas-e arra, hogy a *C. trachomatis* perzisztens formában túléljen benne és onnan esetlegesen a genitális rendszer újrafertőződését okozza, béleredetű Caco-2 sejteket, valamint a *C. trachomatis* fertőzésre használt HeLa229 sejteket fertőztünk. A *C. trachomatis* zárványok a fertőzést követően láthatók voltak mindkét sejtben. A zárványok jelenléte mindkét sejttípusban a folyamatos replikációt jelezte; az inklúziók morfológiája azonban eltérő növekedési kinetikát mutatott IF módszerrel **(13. ábra)** valamint elektronmikroszkóppal vizsgálva. Kísérleteink során a chlamydia genom akkumulációját 3 napon keresztül követtük a sejtekben. A fertőzött sejtek lizátumait használtuk templátként és a *C. trachomatis pyk* gén mennyiségének változását határoztuk meg. A *C. trachomatis* növekedése zavartalan volt a Caco-2 sejtekben, a chlamydia genom mennyisége 72 órával hasonló mértékben nőtt, mint a HeLa229 sejtekben **(14. ábra).** A HeLa229 sejtekben a replikáció tetőpontja 48 órakor volt, majd ezután a mértéke visszaesett; ez utóbbi nem volt látható a Caco-2 sejtek esetében. A Caco-2 sejtekben a cycloheximid hatása nem okozott nagyobb változást a replikáció mértékében.



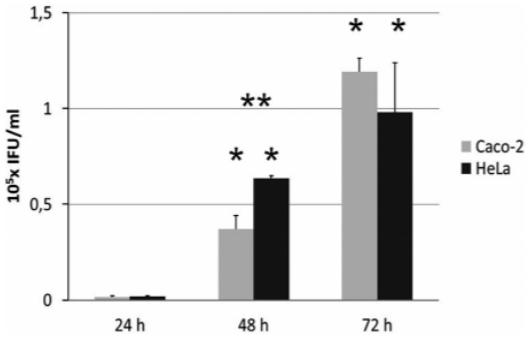
13. ábra. *A C. trachomatis D IF módszerrel festett zárványai a Caco-2 és a HeLa229 sejtekben. A C. trachomatis D fertőzött Caco-2 sejteket 24 órán át (A) vagy 48 órán át (C) inkubáltuk. A fertőzött HeLa229 sejteket hasonlóan 24 (B) és 48 órán át (D) inkubáltuk. A megadott időpontok után a sejteket indirekt IF módon festettük anti-cLPS antitest és FITC-jelölt anti-egér IgG másodlagos antitest alkalmazásával.*



14. ábra. *C. trachomatis D növekedésének vizsgálata a chlamydia DNS kvantitatív meghatározása alapján qPCR segítségével. A chlamydia gének kimutatását a fertőzött sejtek lizátumában a fertőzés után 0, 24, 48 és 72 órában végeztük. A chlamydia DNS mennyiségének növekedését a fertőzés 0 órájában detektált mennyiségekkel hasonlítottuk össze. (A) a C. trachomatis D pyk gén mennyiségének növekedése cycloheximid jelenlétében, és (B) cycloheximid hiányában.*

Fertőzőképes chlamydia szaporodása Caco-2 és permisszív gazdasejtekben

Annak megállapítására, hogy a fertőzőképes chlamydia termelődése párhuzamos-e a DNS akkumulációjával, a fertőzött sejteket a felülúszójukkal együtt összegyűjtöttük, és a visszatenyészthető, életképes *C. trachomatis* kvantitatív meghatározására a mintákat McCoy sejtre oltottuk. A kísérlet eredményei alapján a fertőző chlamydia visszatenyészthető, ami azt mutatja, hogy a Caco-2 sejtvonalban a teljes replikációs ciklus lezajlott. A *C. trachomatis* növekedése kissé késett a Caco-2 sejtekben, de a fertőzés után 72 órával hasonló mennyiségű *C. trachomatis*t tenyésztettünk vissza a Caco-2 sejtekből, mint a HeLa229 sejtekből **(15. ábra).**

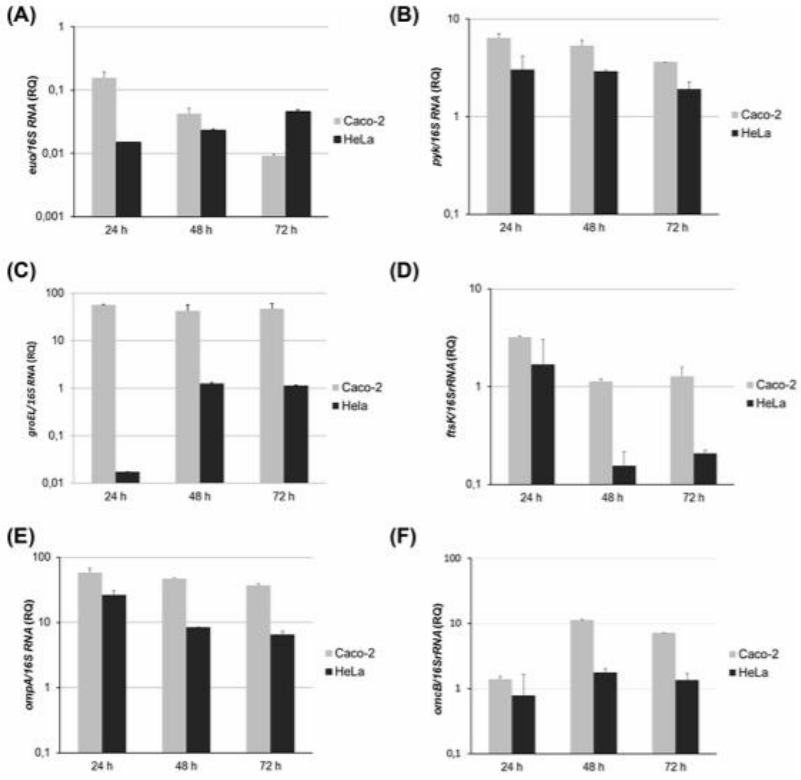


15. ábra. *A C. trachomatis replikációjának kinetikája Caco-2 és HeLa229 sejtekben. A C. trachomatis fertőzött Caco-2 és HeLa229 sejtek lizátumait és felülúszóit különböző időpontokban gyűjtöttük be a fertőzés után, és ráoltottuk McCoy sejtekre. Az inklúziókat immunfluoreszcencens festéssel vizualizáltuk. Az ábra a titerek átlagát IFU/ml-ben kifejezve és az SD-t 3 párhuzamos tenyészet alapján mutatja. A * statisztikailag szignifikáns különbségeket mutat az azonos sejttípus, ** a különféle sejttípus felülúszójában mért értékek között. P<0.05.*

Chlamydia gének transzkripciós mintázata Caco-2 és a hagyományos gazdasejtekben

Mivel a *C. trachomatis* replikáció kinetikája különbséget mutatott a Caco-2 sejtekben, a HeLa229 sejtekkel összehasonlítva, megvizsgáltuk néhány kiválasztott chlamydia gén expresszióját a fertőzést követő 3 napos periódus alatt. Úgy gondoltuk, hogy a bélhámsejtek, mint sajátos növekedési környezet, kihathatnak a chlamydia génexpressziós mintázatának változására. A relatív génexpressziós szinteket a 16S rRNS expressziójára normalizáltuk. A fertőzés után 24 órával, a korai klaszter gén, az *euo* relatív expressziója **(16A ábra)** sokkal alacsonyabb volt a HeLa229 sejtekben, mint a Caco-2 sejtekben, és későbbi időpontokban növekedett meg, amikor a replikáció mértéke már alacsonyabb volt. A *C. trachomatis* D *pyk, ompA, ftsK* és *omcB* génjeinek relatív expresszió **(16 ábra)** hasonló tendenciát mutatott, a

két vizsgált sejtvonalban, de a relatív expresszió magasabb szinten perzisztált Caco-2 sejtekben, mint a HeLa229 sejtekben. 24 óra elteltével a *pyk* gén expressziója az idő múlásával fokozatosan csökkent, hasonló sebességgel mindkét vizsgált sejtvonalban **(16B ábra).** Az *ompA* gén expressziójának legmagasabb szintjét a 24 órás mintában tapasztaltuk, és hosszabb ideig magas szinten maradt a Caco-2 sejtekben, mint a HeLa229 sejtekben **(16E ábra).** Az *ftsK* legmagasabb expresszióját a fertőzés után 24 órával, a citokinezis idején figyeltük meg, és a Caco-2 sejtekben ez a későbbi időpontokban is magas szinten maradt **(16D ábra).** A kései *omcB* gén expressziója a fertőzés után 48 órával tetőzött, és a Caco-2 sejtekben magasabb volt, mint a HeLa229 sejtekben **(16F ábra).** A Caco-2 sejtekben folyamatosan magas *groEL* expressziót figyeltünk meg, a legkorábbi, 24 órában vizsgált időpontban is **(16C ábra).** A *groEL* gén expressziójának növekedése csak 48 órával a fertőzés után következett be a HeLa229 sejtekben.



(G)

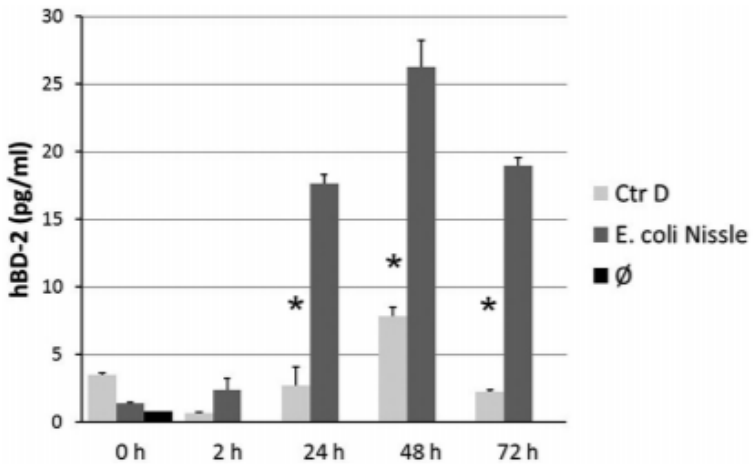
Gene	Caco-2/HeLa		
	24 h	48 h	72 h
euo	10,46	1,85	0,20
ftsK	1,90	7,32	6,16
groEL	3285,74	33,97	42,02
pyk	2,09	1,83	1,90
ompA	2,20	5,59	5,67
omcB	1,77	6,37	5,33

4000	10	2	0,1

16. ábra. *A C. trachomatis D gének relatív expressziójának időbeli alakulása Caco-2 és HeLa229 sejtekben. A cDNS-t Caco-2 és HeLa229 sejtekből állítottuk elő különböző időpontokban a fertőzést követően. qRT-PCR-t végeztünk az (A) euo, (B) pyk, (C) groEL, (D) ftsK, (E) ompA és (F) omcB gének relatív expressziójának kvantitatív meghatározására; az expressziós szinteket normalizáltuk a 16S rRNS gén expressziójára. Az ábra az expressziós szintek változásait mutatja (RQ). (G) A Caco-2 sejtekben detektált relatív génexpressziós értékek arányai a HeLa229 sejtekéhez viszonyítva. A kiszámított különbségeket színskálája oszlop mutatja, ahol a vörös-fehér szín különböző árnyalata a megnövekedett génkifejeződést jelölik; a zöld szín pedig a csökkent expressziót.*

A *C. trachomatis* hBD-2 indukáló képessége Caco-2 sejtekben

A Caco-2 sejtek bélnyálkahártya eredetű hámsejtek, ez a sejttípus fontos szerepet játszik a vastagbélben található kórokozók elleni fiziológiás védelemben. Mivel a hBD-2-t mikrobiális elemek indukálják, megvizsgáltuk, hogy a *C. trachomatis* képes-e kiváltani ezen antimikrobiális peptid termelését. A hBD-2 fehérje emelkedett mennyiségben volt jelen a pozitív kontrollként használt *E. coli* Nissle törzzsel stimulált Caco-2 tenyészetek felülúszójában **(17. ábra).** A *C. trachomatis* D indukálta a sejtekből a hBD-2 felszabadulását, azonban ennek szintje szignifikánsan alacsonyabb volt az *E. coli* Nissle-stimulált felülúszóéval összehasonlítva.



17. ábra. *Chlamydia fertőzésre kialakult hBD-2 termelés Caco-2-sejtekben. A nem fertőzött sejtek (ø), a C. trachomatis D-vel (Ctr D) vagy hőkezelt E. coli Nissle törzzsel fertőzött sejtek felülúszóit különböző időpontokban gyűjtöttük be. A hBD-2 termelődését ELISA-val teszteltük. Az oszlopok a koncentráció átlagát és SD-t mutatják (3 párhuzamos tenyészetben). A *statisztikailag szignifikáns különbségeket mutat a chlamydia fertőzött sejtek felülúszójában mért értékek és az E. coli Nissle-lel kezelt sejtek felülúszójában mért értékek között; P<0.05.*

Kísérleteink során bizonyítottuk, hogy a *C. trachomatis* képes replikálódni a bél eredetű Caco-2 sejtekben, bár a szaporodási kinetikája eltért a HeLa229 sejtekben tapasztalthoz képest, ezt alátámasztotta, hogy kisebb genom és visszatenyészthető chlamydia mennyiséget mértünk a fertőzés után 48 órával, bár a fertőzés után 72 órára ezek az értékek hasonlóak voltak a két sejttípusban. Ezek alapján arra a következtésre jutottunk, hogy a Caco-2 sejtek alkalmasak arra, hogy megfelelő környezetet biztosítsanak a bélben a perzisztáló chlamydia túlélésére.

A chlamydiák fejlődési ciklusa transzkripciós szinten szabályozott [244]. A transzkripciós profil megváltozását *in vitro* modellekben kimutatták, amelyekben különböző stimulusok (IFN-γ, penicillin) segítségével indukálták a chlamydiák perzisztens alakjának kialakulását. Bizonyos sejttípusok nem megfelelő „gazdák" a chlamydia számára (bennük a chlamydia nem tud a „klasszikus" módon szaporodni), ezekben a sejtekben a transzkripciós mintázat a perzisztens formára emlékeztet [245]. 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 génexpressziós vizsgálatunkhoz a chlamydia fejlődési ciklusának korai (*euo*), középidős (*ompA, GroEL, pyk*) és kései (*omcB*) szakaszából, valamint a sejtosztódással (*ftsK*) kapcsolatos géneket válogattunk, és a kifejeződésüket a 16S rRNS kifejeződésére normalizáltuk. Az *eou* gén termékéről leírták, hogy gátolja a kései géneket [246], így ezen gén csökkent kifejeződése a Caco-2 sejtekben magyarázhatja a magasabb *omcB* kifejeződést (mely az EB fontos membránproteinjét kódolja) még a fertőzés kései szakaszában is. Az EOU protein kötődését az *ftsK* promoterhez már korábban leírták [247], a cytokinesissel kapcsolatos *ftsK*

gén folyamatos magas szintjét okozhatja az *euo* gén csökkenő kifejeződése Caco-2 sejtekben. A sejtosztódáshoz szükséges *ftsK* transzkritumokat már a chlamydia szaporodás első napjától magas szinten mértünk, amikor a baktérium a legnagyobb mértékű osztódást mutatja. Eredményeink alapján úgy tűnik, hogy a bakteriális sejtosztódás a HeLa229 sejtekben hamarabb lezajlik, mint a Caco-2 sejtekben. A *C. trachomatis* ATP szintézissel kapcsolatos *pyk* génjének expressziója 48 óra után csökkent a Hela229 sejtekben. Ez szinkronban volt az ezen sejtvonalban kimutatott chlamydia kromoszóma mennyiségének csökkenésével. Ezzel összhangban a *pyk* hosszabb, magas szintű expressziója a Caco-2 sejtekben a genom folytatólagos halmozódásával járt együtt. Az *ompA* gén expressziós szintjének változásának tendenciája hasonló volt mindkét sejtvonalban. A *pyk* és *ompA* géneket a középidős géneknek (amikor a RB-k felhalmozódnak és az EB-k kezdenek kialakulni) tekintik [244]. A *C. trachomatis groEL* génje, a Hsp60-at (GroEL-1) kódoló génje a Caco-2 sejtekben erősen expresszálódott a megfigyelési időszak alatt. A stressz hatására létrejövő GroEL-1 termelődésének növekedését leírták a *C. trachomatis* esetében korábban [248]. Eredményeink arra utalnak, hogy a *C. trachomatis* replikációja a Caco-2 sejtekben bizonyos stressz választ vált ki a baktériumban.

Kutatások arra utalnak, hogy a genitális traktusban a kis antibakteriális molekulák hozzájárulhatnak a tartós gyulladásos reakcióhoz [249], vagy szabályozhatják a gyulladásos és adaptív immunválaszt [250]. Niyonsaba és munkatársai szerint [251] a hBD-2 hatékony neutrophil chemoattraktánsnak tekinthető. A fokozott hBD-2 expresszió hozzájárulhat a gazdaszervezet védekezéséhez a neutrophil sejtek toborzásával. A hBD-k szerepét az éretlen dendritikus sejtek és a memória T-sejtek mikrobiális invázió helyére történő vonzásában is leírták [252]. A hBD expressziójáról írtak olyan nőkben, akik cervicovaginális mintája *C. trachomatis* pozitivitást mutatott, bár szignifikánsan alacsonyabb szintről számoltak be, mint a nem fertőzött kontrollokban [253]. A Caco-2 sejtvonallal végzett kísérleteinkben a *C. trachomatis* fertőzés kismértékben indukálta a hBD-2 termelését, összehasonlítva egy erős induktor (az *E. coli* Nissle törzs) által indukált mennyiséggel. Egér modellben, a *C. muridarum* orális alkalmazása hosszú hordozást és a gyulladásos reakció hiányát okozta a vastagbélben; a nemi szervek fertőzése azonban intenzív gyulladást követően rövid idő elteltével felszámolódott [254]. A chlamydia fertőzött Caco-2 sejtvonal alacsony hBD-2-termelése jele lehet a szuppresszált természetes immunválasznak, és potenciálisan a későbbi csökkent adaptív válasznak is.

Eredményeink alapján a vastagbél eredetű epitheliális Caco-2 sejtvonal kellően permisszív gazdasejt a *C. trachomatis* számára lehetővé téve a baktériumoknak a test ezen 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. Adataink összecsengenek azon korábban leírtakkal, miszerint az urogenitális chlamydia fertőzés gyakran jár együtt anorektális

fertőzéssel nőkben [255], továbbá más kutatók szerint a homoszexuális férfiakból vett végbélmintákban is magas a fertőzöttségi arány [256].

Összefoglalás

Munkánk eredményeként az alábbi új megállapításokat tettük ebben a témában

1. Kimutattuk, hogy a *C. pneumoniae* fertőzés indukálja az IL-17A kifejeződését mRNS és protein szinten a fertőzött egerek tüdejében.
2. Igazoltuk, hogy a *C. pneumoniae* fertőzés során főként a $CD4^+$ sejtek felelősek az IL-17A termelődéséért.
3. Kimutattuk, hogy az IL-17A *in vivo* neutralizálása csökkent chemokin termelődéshez és neutrophil granulocyta beáramláshoz, következményesen nagyobb mennyiségű visszatenyészthető chlamydiához vezetett. Tehát az IL-17A indirekt módon képes a chlamydiák számának csökkentésére.
4. Megállapítottuk, hogy az ismételt *C. pneumoniae* fertőzések kései szakaszában fokozódik az IL-17E mRNS kifejeződése, és ez a fokozódás élő chlamydia jelenlétét igényelte.
5. Kimutattuk, hogy a *C. muridarum*mal történt ismételt fertőzés is indukálja a kései szakaszban az IL-17E expresszióját mRNS és protein szinten.
6. Bizonyítottuk, hogy a *C. muridarum* fertőzött állatok *in vitro* stimulált lépsejtjei IL-17A-t termelnek, viszont nem képesek IL-17E termelésére. Kimutattuk, hogy a *C. muridarum*mal fertőzött egerekben az epithel sejtek felelősek az IL-17E termelődéséért.
7. A *C. pneumoniae* fertőzéses modellben detektáltuk a baktérium DNS-ét, mely nemcsak a tüdőben, de a perifériás vérben is nagy kópiaszámban szinte azonnal megjelent a primer és az ismételt fertőzések után is, valamint a csökkenő kópiaszámot mutattunk ki a fertőzés későbbi szakaszaiban, viszont a *C. pneumoniae* DNS a tüdőben és a vérben még sokáig perzisztált az egerek egy kis hányadában.
8. Igazoltuk, hogy az IgM ellenanyag a reinfekciók során is újra megjelenik az egerek keringésében valamint néhány egérben az IgM szint perzisztálását tapasztaltuk az egyszeri és az ismételt fertőzést követően.
9. Alacsony IgG2a/IgG1 arányt mértünk a primer fertőzést követően, ezzel szemben magasabb IgG2a/IgG1 arányt a reinfekciók után, mely hasznos marker lehet annak elkülönítésében, hogy primer fertőzéssel vagy reinfekcióval állunk-e szemben.
10. Bizonyítottuk, hogy a *C. trachomatis* szaporodik, bár eltérő kinetikával, és megváltozott génexpressziós mintázattal bél eredetű Caco-2 sejtekben, valamint azt, hogy ezen sejtekben alacsony szintű hBD-2 termelést eredményez, ami hozzájárulhat a pathogén gastrointestinális túléléséhez, valamint az onnan történő rekurrens genitális fertőzésekhez.

Eredményeink fontosak a *C. pneumoniae* okozta többszöri fertőzés és annak következtében kialakuló gyulladásos folyamatok megértésében. Emellett eredményeink hasznosak lehetnek a humán fertőzések diagnosztikájában.

4.2. A chlamydiák szerepe krónikus betegségekben

A kórokozók által okozott krónikus/perzisztáló fertőzések szerepét a krónikus betegségek (atherosclerosis, asthma) kialakulásában igazolták. PhD értekezésemben vizsgáltam a *C. pneumoniae* és az atherosclerosis kapcsolatát *in vivo* egér modellben valamint különböző cardiovasculáris betegségben szenvedők szérumában. Ezt a nyomvonalat folytatva összefüggéseket kerestünk a pathogének és további cardiovasculáris megbetegedések között. Kísérleteink során megvizsgáltuk továbbá azt is, hogy az ApoB100only/LDLR$^{-/-}$ egértörzs alkalmas-e a *C. pneumoniae* fertőzés atherosclerosist 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$^{-/-}$ egerek megfertőzhetők-e *C. pneumoniae*val?
4. Megfigyelhető-e az atherosclerosis progressziója *C. pneumoniae* fertőzés következtében normál illetve atherogén diéta mellett az ApoB100only/LDLR$^{-/-}$ egerekben?
5. Kimutatható-e az életképes *C. pneumoniae* az ApoB100only/LDLR$^{-/-}$ egerek aortájában a fertőzést követően?

A *C. pneumoniae* fertőzés és a cardiovasculáris betegségek kapcsolata

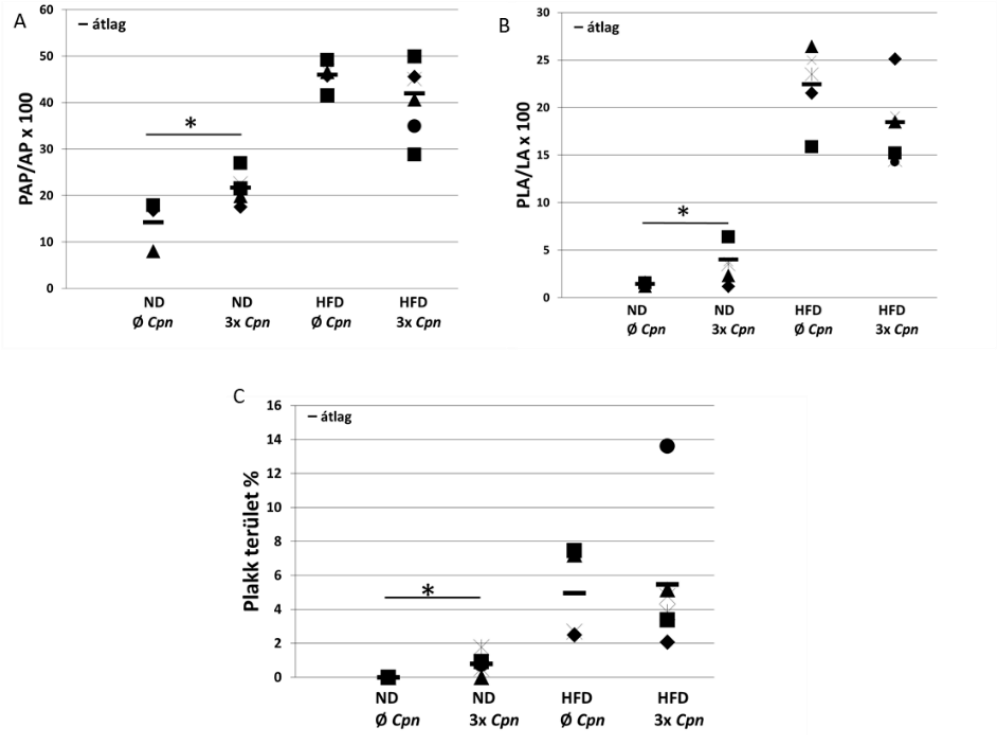
Annak vizsgálatára, hogy különböző pathogének által okozott fertőzések szerepet játszhatnak-e az akut myocardiális infarctus (AMI) kialakulásában, összehasonlítottuk korábban a stabil effort anginás (SEA) és AMI-ban szenvedő betegek szérumának különféle kórokozókra specifikus IgG ellenanyag titereit (*C. pneumoniae*, CMV és HSV-1) 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 adatokra nézve, beleértve az anti-hHsp60 szintet is (diszkrét változók, P=0.029, OR=4.7, vagy folyamatos változók, P=0.037, OR=5.1). A CMV és a HSV-1 ellenanyag titerek hasonlóak voltak az AMI, SEA és a kontroll egyedekben. Nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a SEA és az AMI betegek között egyik kockázati tényezőre vonatkoztatva sem. Eredményeink azt sugallják, hogy a magas *C. pneumoniae* ellenanyagszint a perzisztens fertőzés aktiválódásának vagy egy folyamatos aktív fertőzésnek köszönhető az AMI betegekben. Az elemzéseink alapján az AMI betegekben a magas *C. pneumoniae* ellenanyagszint valamint a hHsp60 ellenanyagszint független rizikófaktoroknak bizonyultak a cardiális esemény kialakulásában, ami arra utal, hogy a kísérletünk során nem a vizsgált pathogének vagy nem fertőzéses eredetű faktorok is indukálhattak endothel sérülést és nagymértékű hHsp60 termelődést [102]. Ez a fajta összefüggés nem volt kimutatható az akut ischaemiás stroke (AIS)-on átesett betegekben. Nem találtunk szignifikáns különbséget a kísérletbe bevont AIS betegek szérumának *C. pneumoniae* specifikus ellenanyag (IgG, IgA, IgM) szintje és a kontrollok között. Ezen eredményeink megegyeznek más kutatók által közölt eredményekkel [257]. Hasonlóan a *C. pneumoniae* esetében tapasztaltakhoz, nem különbözött a két csoport szérumában a HHV-6 és EBV specifikus IgG ellenanyagszint. Viszont

szignifikánsan emelkedett CMV specifikus IgG (*P*=0.015) és HSV-1 IgA (*P*=0.006) szintet detektáltunk az AIS-ban szenvedő betegek között, ami arra utal, hogy más pathogéneknek szerepe lehet a kórkép kialakításában. Egy további vizsgálatunkban 15 atheroscleroticus arteria cerebri media mintából *C. pneumoniae* DNS-t 5-ből amplifikáltuk, amit a 206 bp méretű DNS-fragmentum jelenléte igazolt, míg a 4 egészséges, baleset áldozatainak mintája negatívnak bizonyult a *C. pneumoniae* specifikus nPCR tesztben. Az nPCR-fragmensek szekvenálása az 5 atheroscleroticus mintából 2-ben azonosította a *C pneumoniae ompA* szekvenciáját. Az 5 nPCR pozitív eset közül három szenvedett tünetes cerebrovascularis betegségben (agyi infarktus), míg a 10 nPCR negatív eset közül 2-ben volt tünetes cerebrovascularis betegség. Az esetek kis száma azonban nem tette lehetővé a statisztikai összehasonlítást. A 15 cadaverből 9 esetben a közvetlen halálozás fertőző légúti betegségekkel volt összefüggésben, az nPCR pozitív és negatív egyének között egyenletes eloszlás volt tapasztalható. Mivel nem volt különbség a légzőszervi betegség, mint a közvetlen halálok incidenciájában az nPCR pozitív és a negatív esetek között, valószínűtlen, hogy a *C. pneumoniae* nPCR pozitivitás a fennálló fertőző betegség miatt alakult ki. A légúti megbetegedés esetükben inkább egy terminális betegség, amelyek néhány nappal a halál előtt fejlődhetett ki. Az intimális plakkok TEM képe az 5 nPCR pozitív atheroscleroticus artéria mintából a *C. pneumoniae* EB-re emlékeztető struktúrákat mutatott. Ezek a struktúrák körte alakúak, nagy denzitású maggal rendelkeztek és átmérőjük kb. 0.3 µm, azaz hasonlóak a kontroll fertőzött szövettenyészet sejtekben kimutatott EB méretéhez. A TEM segítségével vizsgált 5 nPCR negatív atheroscleroticus minta egyike sem mutatott *C. pneumoniae*re utaló struktúrákat. A *C. pneumoniae* számos olyan tulajdonsággal rendelkezik, amelyek az érfalak krónikus fertőzéséhez és végül az atherosclerosishoz vezethetnek lokális trombózissal. A baktérium *in vitro* replikálódik az endothel, a simaizom sejtekben és macrophágokban, indukálja az adhéziós molekulák expresszióját, megemeli a vérlemezke adhéziót, a prokoaguláns aktivitást az endothel sejtekben, és indukálja olyan cytokinek termelését, mint a TNF-α, IL-1β és IL-6 a monocytákban [258] [258] [259] [260]. A *C. pneumoniae*t kimutatták az érrendszer különféle helyein az atheroscleroticus szövetekben, beleértve a nyaki ereket, a coronariákat, az aorta billentyűt, az aortát és az alsó végtag artériáit. Egy 23 vizsgálat eredményeinek összefoglalása azt mutatta, hogy immunhisztokémiai úton vagy PCR-rel a *C. pneumoniae* a beteg artériák 52%-ában (497-ből 257-ben), a kontroll erek 5%-ában mutatható ki [261]. A *C. pneumoniae* jelenléte a középső agyi artériás atheroscleroticus plakkokban nem feltétlenül jelenti azt, hogy a *C. pneumoniae* a betegség oki tényezője; inkább felveti annak a lehetőségét, hogy a baktérium szerepet játszik a betegség pathomechanizmusában.

Az ApoB100only/LDLR$^{-/-}$ egér modell jelentősége a fertőzés hatásának vizsgálatában az atherosclerosis kialakulására

Bár az ApoB100only/LDLR$^{-/-}$ egerek hűségesebben tükrözik a humán atherosclerosis lipidprofilját, alkalmazhatóságukat még nem vizsgálták korábban a *C. pneumoniae* fertőzés atherosclerosis progressziójára gyakorolt hatásának tanulmányozására. Annak tisztázására, hogy a *C. pneumoniae* képes-e megfertőzni ezt az egértörzset, a kórokozót intranasalisan juttatuk be az állatokba. Kísérletünk eredményeként az összes fertőzött egér termelt *C.*

pneumoniae specifikus ellenanyagot. A normál vagy magas zsír-/koleszterintartalmú táplálékkal etetett egerek hasonló szintű *C. pneumoniae* specifikus IgG antitesteket termeltek (OD 0.36–0.41, 100-szoros hígításban vizsgálva). A háromszor *C. pneumoniae*val fertőzött atherogén étrenddel táplált egerek aorta sinusában hasonló pathológiás elváltozásokat figyeltünk meg, mint a fertőzetlen egerekben. A kvantitatív értékelés nem mutatott szignifikáns különbséget a lumen plakkokkal borított kerületének hosszában, **(18A ábra)** és a plakk által elfoglalt lumen terület méretében **(18B ábra).** A normál étrenddel táplált, nem fertőzött állatok aorta szakaszai nagyon korai stádiumú, kis kiterjedésű atherosclerosis jelét mutatták, egyetlen réteg habos sejttel. Ugyanakkor a *C. pneumoniae*val többször fertőzött egerekben (normál diétán tartott) jelentős növekedést tapasztaltunk a lumen plakkokkal borított kerületének hosszában (P<0.05) **(18A ábra)** és a plakk által elfoglalt terület méretében (P<0.05) **(18B ábra)** is, összehasonlítva a normál étrenden tartott nem fertőzött állatok aorta elváltozásaival. Megvizsgáltuk a hosszirányban felnyitott leszálló aorta luminális felszínét is. A normál étrenddel táplált, nem fertőzött állatok aortájának kis területén láttunk atherosclerotikus elváltozásokat. Az atherosclerosis által érintett területet szignifikánsan nagyobbnak mértük a fertőzött állatok leszálló aortájában. A magas zsír-/koleszterintartalmú táppal etetett állatokban a plakkokkal borított felszín szignifikánsan megnövekedett a normál táplálású egerekkel összehasonlítva; azonban a fertőzés nem fokozta a léziók képződését a leszálló aorta falában **(18C ábra).**



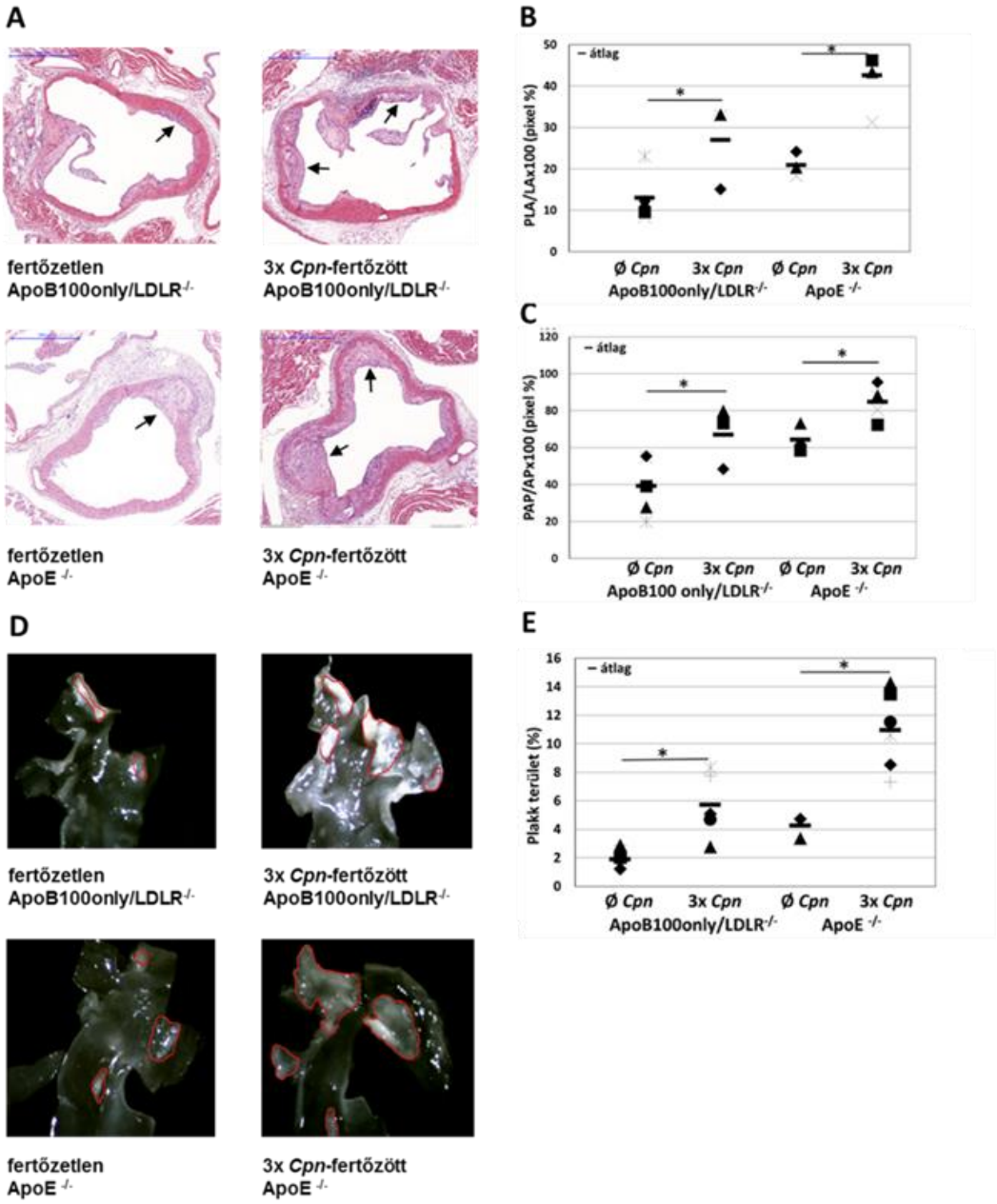
18. ábra. *Atheroscleroticus plakkok morfometriai elemzése ApoB100only/LDLR$^{-/-}$ egerekben. (A) Plakkokkal borított aorta luminalis kerületének mérése (PAP/AP×100); (B) a plakkok által elfoglalt aorta lumen terület százalékos aránya (PLA/LA×100) az aortagyök keresztmetszetében. (C) a leszálló aorta plakkokkal borított területének %-a. ND: normál diéta, HFD: magas zsírtartalmú diéta, 3x Cpn: 3x C. pneumoniae fertőzött, *P<0.05.*

Az életképes C. pneumoniae kimutatható az ApoB100only/LDLR$^{-/-}$ egerek aortájában

A baktérium perzisztenciáját a korai szakaszban, azaz egy héttel az első fertőzés után és négy héttel az egyszeri fertőzés után, valamint a háromszori *C. pneumoniae* fertőzés utáni 9 és 12 hetes időpontokban real-time PCR segítségével teszteltük. Egy és négy héttel az első oltás után a chlamydia 16S rRNS expresszió kimutatható volt, a negyedik héten kb. 1000-szer alacsonyabb relatív expressziós szinttel, mint az egy hetes időpontban. Öt héttel a harmadik fertőzést követően az aortában metabolikusan aktív *C. pneumoniae*t detektáltunk, melynek relatív expressziós szintje hasonló volt az egyszer fertőzött egerek 4. heti mintájának expressziójával.

Az atherosclerosis súlyosságának fokozódása normál étrenddel táplált C. pneumoniae fertőzött ApoB100only/LDLR$^{-/-}$ és ApoE$^{-/-}$ egerek aortájában

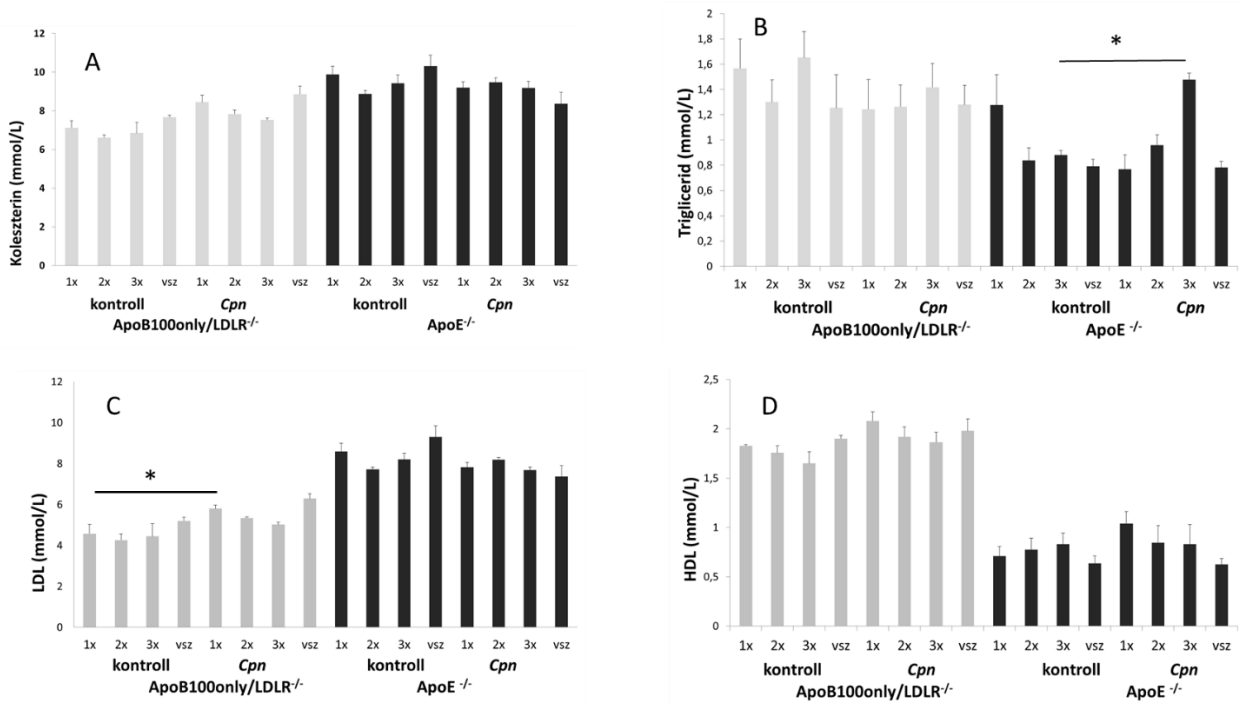
A fenti eredmények alapján összehasonlító kísérletet végeztünk, ugyanazt a fertőzési protokollt alkalmaztuk az ApoB100only/LDLR$^{-/-}$ és az ApoE$^{-/-}$ egerekben, normál étrend mellett. A *C. pneumoniae* specifikus ellenanyagválasz (IgM, IgG, IgA) nem különbözött szignifikánsan a két egér törzsben. Az IgA szint általában alacsonyabb volt az ApoE$^{-/-}$ egerekben; a különbség azonban nem volt szignifikáns. Normál táplálékkal táplált ApoB100only/LDLR$^{-/-}$ egerekben az aorta léziók főként egy vagy több rétegben habos macrophágokat tartalmaztak, de néhány érettebb plakkot is észleltünk koleszterin kristályokkal és nekrotikus maggal. Az ApoE$^{-/-}$ egerekben számottevő előrehaladott léziót találtunk nekrotikus maggal és koleszterin maradékkal. A *C. pneumoniae* fertőzött ApoB100only/LDLR$^{-/-}$ egerekben nagyobb, érett plakkokat, a fertőzött ApoE$^{-/-}$ egerekben több plakkot, nekrotikus magot és koleszterin kristályt találtunk. Az eredmények azt mutatták, hogy ApoE$^{-/-}$ egerekben az atherosclerosis kifejezettebb, mint az ApoB100only/LDLR$^{-/-}$ egerekben **(19A ábra)**. Az aorta sinusban az eltérést a plakk által elfoglalt lumenterület méretéke **(19B ábra)**, és az aorta felületének plakkokkal borított kerülete **(19C ábra)** mutatta. A leszálló aorta léziói szintén nagyobbak voltak az ApoE$^{-/-}$ egerekben, mint az ApoB100only/LDLR$^{-/-}$ egerekben **(19D,E ábra)**. A *C. pneumoniae* fertőzés hatásának elemzésekor szignifikáns fokozódást tapasztaltunk a mért értékekben. Az aorta sinus metszeteiben a lumen plakkokkal borított területe **(19B ábra),** a plakk által elfoglalt lumen kerület **(19C ábra)** és a plakk mérete a leszálló aortában **(19E ábra)** 2.08-szoros (P=0.035), 1.7-szeres (P=0.004) és 2.5-szeres (P=0.001) volt az ApoB100only/LDLR$^{-/-}$ egerekben, míg az ApoE$^{-/-}$ egerekben 2.04-szeres (P=0.019), 1.32-szeres (P=0.026) és 2.56-szoros (P= 0002).



19. ábra. *Az atherosclerosis összehasonlító mennyiségi értékelése ApoB100only/LDLR$^{-/-}$ és ApoE$^{-/-}$ egerekben. (A) aorta gyöki keresztmetszet H&E festve. (B) plakkal borított aorta lumen területe %-ban, (C) Plakkal borított aorta lumen kerülete %-ban (D) proximális aorta in situ mikroszkópos képe, (E) leszálló aorta plakkal borított területének %-a. PLA/LA: plakk által borított terület, PAP/AP: plakk kerülete, 3xCpn: 3-szor C. pneumoniae oltott, a nyilak az atheroscleroticus elváltozásra mutatnak, *P<0.05.*

Plazma lipidszint alakulása az ApoB100only/LDLR$^{-/-}$ és az ApoE$^{-/-}$ egerekben

Az egerek plazmamintáiban megvizsgáltuk a lipidszinteket. Minden egyes vizsgált időpontban, függetlenül a fertőzés státuszától az ApoE$^{-/-}$ egerek magasabb összkoleszterin szintet mutattak, mint az ApoB100only/LDLR$^{-/-}$ egerek **(20A ábra).** A nem fertőzött ApoB100only/LDLR$^{-/-}$ egerek plazmájában a triglicerid-koncentráció magasabb volt, mint az ApoE$^{-/-}$ egerekben **(20B ábra)**. Az 1. és 2. fertőzés nem okozta a trigliceridszint emelkedését, de a harmadik *C. pneumoniae* oltás az ApoE$^{-/-}$ egerekben szignifikáns emelkedést eredményezett (*P*=0.001). Az ApoB100only/LDLR$^{-/-}$ egerek esetében nem volt egyértelmű a fertőzéssel kapcsolatos trigliceridszint változás. Az LDL plazmakoncentrációja magasabb volt az ApoE$^{-/-}$ egerekben, mint az ApoB100only/LDLR$^{-/-}$ egerekben **(20C ábra).** A fertőzéssel kapcsolatos szignifikáns LDL-szint növekedés csak az ApoB100only/LDLR$^{-/-}$ egerekben volt (*P*=0.04). A HDL plazmakoncentrációja általában magasabb volt az ApoB100only/LDLR$^{-/-}$ egerekben, mint az ApoE$^{-/-}$ egerekben, és ezekben az egerekben ennek koncentrációja a megfigyelési időszak végére csökkent, viszont magas maradt az ApoB100only/LDLR$^{-/-}$ egerekben **(20D ábra).** A fertőzés nem befolyásolta a HDL szintet.



20. ábra. *Plazma lipidszint alakulása egerekben. Az ApoB100only/LDLR$^{-/-}$ és ApoE$^{-/-}$ valamint a kontroll egerek szérum mintái az első (1x), a második (2x) és a harmadik (3x) C. pneumoniae fertőzés után 1 héttel, valamint a kísérlet végén (12. hét),* ***(a)*** *teljes koleszterol,* ***(b)*** *triglicerid,* ***(c)*** *LDL és* ***(d)*** *HDL tartalom tekintetében. A lipid koncentrációkat mmol/L-ben fejeztük ki; az egyes egérszérumokban mért értékek átlaga és SD alapján. *P=0.01 vsz=végső szérum*

Az ApoE$^{-/-}$ egereket széles körben használják az atherosclerosis állatmodelljeként; ezen egértörzs lipoprotein metabolizmusa azonban különbözik a hiperkoleszterinémiában szenvedő emberek metabolizmusától. Az ApoE$^{-/-}$ egerek a plazmájukban nagy mennyiségű ApoB48 tartalmú, nagyon alacsony sűrűségű lipoprotein (VLDL) osztályba tartozó lipoproteint

halmoznak fel, míg az atherosclerosisban szenvedő emberek szinte mindig magas szintű koleszterin-gazdag LDL-lel rendelkező ApoB100-at [111]. Számos publikáció, amely a *C. pneumoniae* és az atherosclerosis kapcsolatát vizsgálta, az ApoE$^{-/-}$ modellt használta arra, hogy feltárja a kórokozó atherosclerosist indukáló képessége és/vagy a progressziója közötti kapcsolatot [262] [263]. A vizsgálataik során arra jutottak, hogy a *C. pneumoniae* fertőzés a hiperlipidémiával együtt súlyosbítja az atherosclerosist; valamint az ApoE hiánya befolyásolhatja a kórokozóval szembeni immunválaszt és fokozottabb ellenállást biztosít az érrendszeri fertőzésekkel szemben [263]. Kísérleteink során azt vizsgáltuk, hogy a többszöri *C. pneumoniae* fertőzés miképp befolyásolja az atherosclerotikus plakkok kialakulását ApoB100only/LDLR$^{-/-}$ egértörzsben, melyet a humán familiáris hiperkoleszterinémia legmegfelelőbb modelljének lehet tekinteni [109].

Az ApoB100only/LDLR$^{-/-}$ egértörzset úgy hozták létre genetikailag, hogy a plazma koleszterin nagy részét az LDL osztályba tartozó ApoB100 tegye ki, és atherosclerosis alakuljon ki bennük alacsony zsírtartalmú rágcsáló diétán. Kísérleteink során először azt akartuk tisztázni, hogy az ApoB100only/LDLR$^{-/-}$ egerek szolgálhatnak-e modellként a *C. pneumoniae* atherosclerosist fokozó szerepének vizsgálatára. Ezért az egerek csoportjait normál vagy magas zsír-/koleszterintartalmú táplálékkal etettük, többször megfertőztük, hogy nyomon követhessük az atherosclerosis kialakulását *C. pneumoniae* újrafertőződéssel összefüggésben. A kísérleteink eredményei azt mutatják, hogy az ApoB100only/LDLR$^{-/-}$ 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 atherosclerosist a *C. pneumoniae* fertőzés nem súlyosbította tovább. Így minden további kísérletet a normál étrenden tartott egerekkel végeztünk. Eredményeink részben összhangban állnak Moazed és munkatársai által leírtakkal, miszerint a *C. pneumoniae* fertőzés gyorsítja az atherosclerosist a normál étrenden tartott ApoE$^{-/-}$ egerekben. Az atherosclerosis azonban súlyosbodott azon ApoE$^{-/-}$ egerekben is, melyeket magas zsírtartalmú étrendben tartottak és egy vagy három ismételt *C. pneumoniae* fertőzésnek tettek ki [262] [264].

Azt feltételeztük, hogy az ApoB100only/LDLR$^{-/-}$ és az ApoE$^{-/-}$ 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$^{-/-}$ és ApoE$^{-/-}$ egerekben. Nazzal és mtsai. [263] arról számoltak be, hogy az ApoE$^{-/-}$ egerek több *C. pneumoniae* specifikus antitestet termeltek, mint a vad típusú egerek, amelyet az ApoE hiányának tulajdonítottak. Eredményeink nem támasztják alá ezt az elméletet, tekintve, hogy az ApoB100only/LDLR$^{-/-}$ egerekben az ismételt *C. pneumoniae* fertőzés magas szintű ellenanyag termelést eredményezett az ApoE deficiencia nélkül is.

A fertőzés másik jeleként, (a Koch posztulátum igazolásaként) az aorta mintákban az első fertőzés után 9 héten keresztül metabolikusan aktív *C. pneumoniae*t tudtunk detektálni az

ApoB100only/LDLR$^{-/-}$ egerekben. Korábbi vizsgálatok kimutatták az élő *C. pneumoniae* jelenlétét az ismételten fertőzött ApoE$^{-/-}$ egerek aortájában, ezenkívül a bakteriális DNS-t későbbi időpontban [265]. Amint azt Campbell és Rosenfeld [266] összegezte, számos bizonyíték mutat arra, hogy a *C. pneumoniae* képes *in vivo* tartós fertőzést kialakítani. Eredményeink megerősítik a perzisztáló chlamydia jelenlétét, mivel a 16S rRNS gén kifejeződése arra utal, hogy a metabolikusan aktív baktérium is megtalálható a lézióban, nem csak a fertőzések után megmaradó a DNS vagy antigén. Ezek alapján feltételezhető, hogy az életképes chlamydia hosszú távú jelenléte egyes fertőzött egerek aortájában hozzájárulhat a fertőzés atherogén hatásához.

Az azonos korú, nőstény ApoE$^{-/-}$ egerekben előrehaladottabb atherosclerosist találtunk, mint az ApoB100only/LDLR$^{-/-}$ egerekben a 12 hetes megfigyelési időszak végén. Kevésbé kifejezett különbséget Powell-Braxton és mtsai. is leírtak [109]. Korábban leírták, hogy a *C. pneumoniae* a máj zsírsav-egyensúly zavarát [267], a lipid metabolikus gének diszregulációját [268] és a macrophágok megváltozott koleszterin homeosztázisát [269] okozhatja; azonban az egerekkel végzett vizsgálatok többsége nem észlelte a plazma lipidprofiljának jelentős változásait a *C. pneumoniae* fertőzés után ApoE$^{-/-}$ egerekben [189] [262]. A triglicerid koncentráció növekedését az ApoE$^{-/-}$ egerek ismételt fertőzése után, az eredményeinkhez hasonlóan, Rothstein és mtsai is megfigyelték [188]. Az ApoE hiánya lehet az oka a trigliceridszint emelkedésének krónikus fertőzésben, amelyet a többszöri oltás okozott ApoE$^{-/-}$ egerekben. Az ApoE-ről ismert, hogy védelmet nyújt a bakteriális lipopoliszacharid [270] által kiváltott gyulladás és a lipid-anyagcsere gyulladásos változásaival szemben [271]. Az ApoB100only/LDLR$^{-/-}$ egerekben az elsődleges fertőzés után az LDL szint korai emelkedésének a fertőzés által okozott gyulladás is oka lehet [272]. Kísérleteink alapján született megállapításaink alátámasztják Kontula és mtsai. által leírtakat, [273] mely szerint szignifikáns összefüggés lehet a *C. pneumoniae* krónikus fertőzés és a szívkoszorúér-betegség fokozott kockázata között a familiáris hiperkoleszterinémiában szenvedő betegek esetében.

Az ApoB100only/LDLR$^{-/-}$ egértörzset eddig még nem alkalmazták a fertőzések atheroschlerosist fokozó hatásának vizsgálatára. Eredményeink szerint ebben az egértörzsben a chlamydia fertőzést az érfal hosszan tartó fertőzése követi, ami hozzájárulhat a fertőzés érfalra gyakorolt direkt hatásához. Mivel az ApoE hiány megváltoztathatja a *C. pneumoniae* fertőzéssel szembeni immunválaszt a vad típusú egerekéhez képest, az ApoB100only/LDLR$^{-/-}$ egerek alkalmazása újabb információval szolgálhat a *C. pneumoniae* indukálta fokozott atheroschlerosisban szerepet játszó immunmechanizmusokról. A humán familiáris hiperkoleszterinémia e modelljében végzett kísérleteink eredményei további bizonyítékkal szolgálnak a *C. pneumoniae* fertőzés proatherogén szerepére. Mivel ebben az egértörzsben az ismételt *C. pneumoniae* fertőzés képes súlyosbítani az atherosclerosis fejlődését a normálistól eltérő lipoprotein szintekkel magas zsír/koleszterin tartalmú diéta alkalmazása nélkül, javasoljuk ennek az egértörzsnek, mint egy alternatív modellnek a használatát a fertőzésnek az atherosclerosis kialakulásában játszott szerepének vizsgálatára.

Összefoglalás

Munkánk eredményeként az alábbi új megállapításokat tettük ebben a témában

1. Nem találtunk összefüggést a *C. pneumoniae* szeropozitivitás és az ischaemiás stroke előfordulása között.
2. Sikeresen detektáltuk a *C. pneumoniae* DNS-t a vizsgált szklerotikus arteria cerebria mediák 33 %-ában, a kórokozót nem tudtuk detektálni a balesetben elhunyt egyének artéria cerebri media szakaszaiban.
3. Bizonyítottuk, hogy az ApoB100only/LDLR$^{-/-}$ egerek megfertőzhetők *C. pneumoniae*-val, és az élő kórokozó kimutatható az aortájukból.
4. Bizonyítottuk, hogy az ApoB100only/LDLR$^{-/-}$ egerekben vizsgálható a *C. pneumoniae* fertőzés következtében kialakuló atherosclerosis progressziója normál diéta mellett.

4.3. Az IFN-γ szerepe a chlamydia fertőzésekben

Ebben a témában az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

1. Miképp befolyásolja az IFN-γ 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-γ 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* 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-γ termelődését és az befolyásolja-e a visszatenyészthető *C. pneumoniae* mennyiségét?

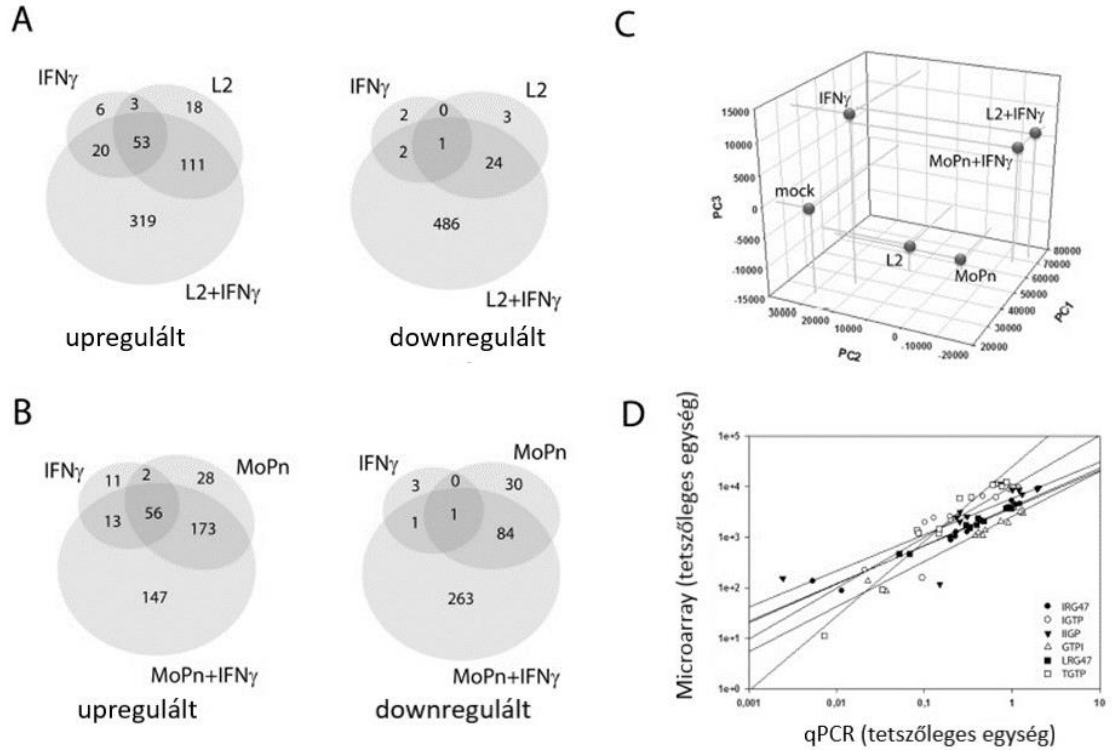
A chlamydia fertőzött és/vagy IFN-γ kezelt egér epitheliális sejtek tanulmányozása DNS microarray módszerrel

Kísérleteink célja volt, hogy általános képet kapjunk arról, hogy az IFN-γ hogyan befolyásolja a chlamydiával fertőzött egér epitheliális sejtek transzkripcióját. Kétféle chlamydiával dolgoztunk, a humán eredetű *C. trachomatis* L2 típussal és az egér pathogén *C. muridarum*mal, hogy ellenőrizhessük, hogy a létrejött transzkripciós változások mennyire törzsspecifikusak. Egér epitheliális sejteket fertőztünk és/vagy kezeltünk IFN-γ-val, majd 24 óra múlva a kezelést követően a mintákat DNS microarray analízissel elemeztük, a statisztikai adatokat Affymetrix MAS 5.0 program segítségével nyertük [208].

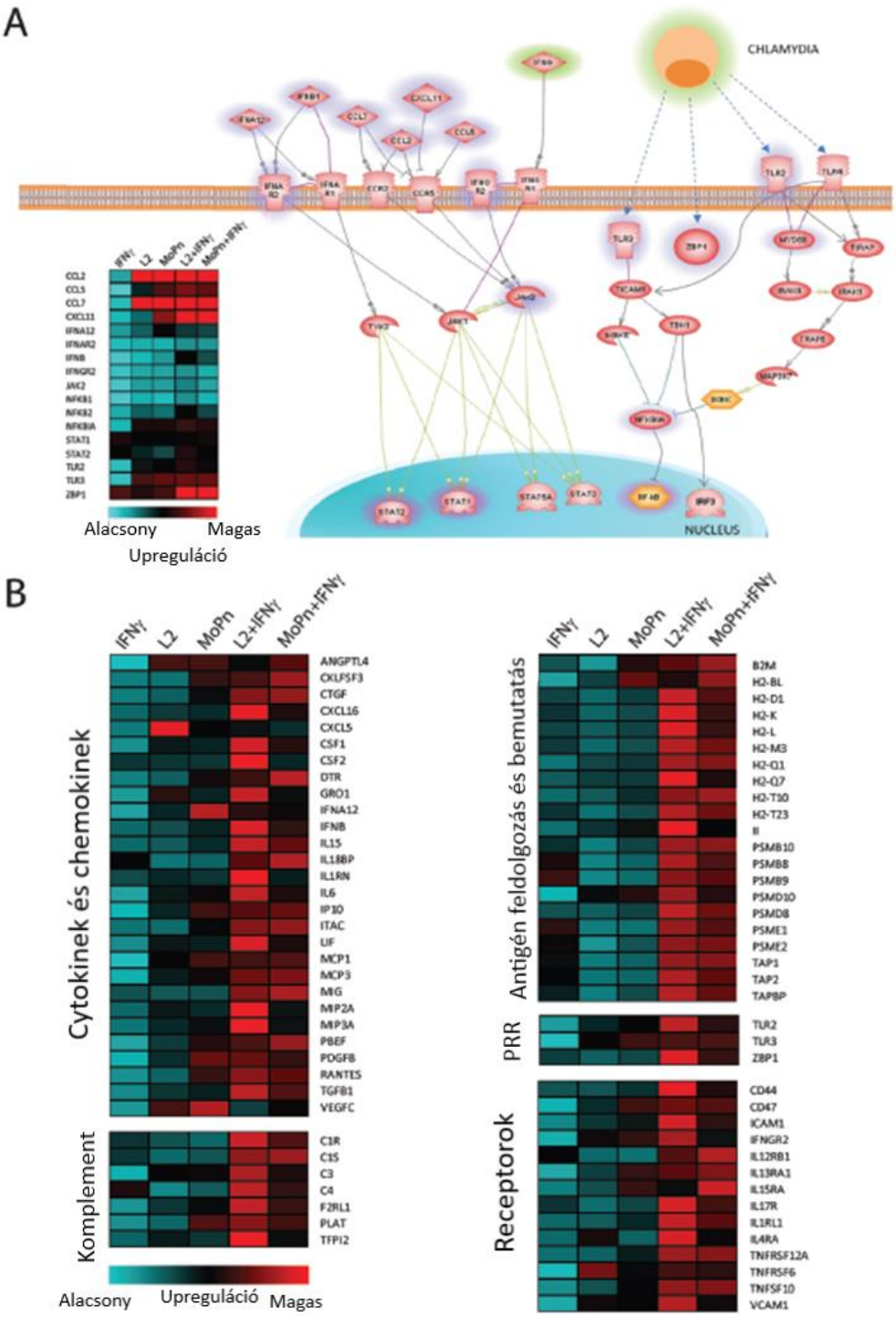
A DNS chip analízis azt mutatta, hogy a chlamydia fertőzés és az IFN-γ együttes kezelés fokozta az epitheliális sejtek génexpresszióját. Abban az esetben, ha csak IFN-γ-val kezeltük a sejteket a fokozott kifejeződést mutató gének száma 82 volt, a csak *C. trachomatis* L2 törzzsel fertőzött sejtekben 185 gén esetében találtunk fokozott expressziót. A kombinált kezelés (chlamydia és IFN-γ) viszont 503 gén expresszióját fokozta. A negatív irányban elmozdult génkifejeződés hasonló mintázatot mutatott, de még drámaiabbak voltak a változások. Az IFN-γ kezelés 5 gén kifejeződését negatív irányba szabályozta, a chlamydia fertőzés hatására 28 gén downregulálódott, ezzel szemben, ha együttesen alkalmaztuk az IFN-γ-t és a chlamydiát a downregulált gének száma 513 volt **(24A ábra)**. Hasonlóan szignifikáns, fokozott hatást figyelhettünk meg a *C. muridarum* fertőzés esetén is, de a változások kevésbé voltak kiemelkedőek **(24B ábra)**. A kettősen kezelt sejtek egyedi génexpressziós profilja akkor is egyértelmű volt, ha főkomponens analízist (Principal Component Analysis, PCA) végeztünk a génexpressziós adatokkal. A PCA egy matematikai megközelítés a komplex adathalmazok kiterjedésének csökkentésére, segítségével egy egyszerűsített háromdimenziós megjelenítést nyerünk. A minták közül a *C. trachomatis* L2+IFN-γ, valamint a *C. muridarum* (MoPn)+IFN-γ kezelt minták bizonyultak a legjellegzetesebb fő komponenseknek; egy csoportban jelentek meg, a lehető legtávolabb helyezkedtek el a többi csoporttól, mutatva az egyedi transzkripciós mintázatukat **(24C ábra)**. A leginkább upregulálódott és downregulálódott gének is a chlamydia fertőzött+IFN-γ kezelt mintákban voltak. Az immunoresponsive gén1 (IRG-1) mutatta a legmagasabb expressziót, 1845.7-szeresre upregulálódott a kontrollhoz képest. A leginkább upregulálódó (1100-szoros) gének között találtunk számos cytokint, chemokint, mint például a CCL20 (MIP3α)-at, CXCL1 (GROα)-et, CXCL10 (IP-10)-et és a CSF2-t kódoló gént. A génkifejeződés downregulációjának mértéke általában kisebb volt. A legjobban downregulálódott gén a mannóz-kötő lektin szerin proteáz 1, a komplement aktivációs kaszkád lektin útjának a tagja [274] esetében a downreguláció 28.8-szoros volt. A DNS microarray adatokat validáltuk qPCR módszerrel, 6 gént vizsgáltunk minden mintában. A DNS microarray módszerrel valamint a qPCR eljárással kapott adatok meglehetősen jól korreláltak egymással (0.81-0.99) **(24D ábra)**.

A DNS chip analízis eredményeit az a tény is alátámasztja, hogy azok a gazdasejti gének, amelyek indukálhatták a megfigyelt génexpressziós változásokat, szintén upregulálódtak a fertőzött, és a fertőzött és IFN-γ kezelt mintákban. Ezek között a gének között találtunk TLR-t,

IFN-γ receptort, és downstream szignálutakat kódolókat **(25A ábra)**. Általános információt akartunk nyerni az összes szignifikánsan megváltozott funkcionális génről, ezért gén-ontológiai (GO) analízist végeztünk [210][275]. Az upregulálódott géncsoportok GO vizsgálata alapján a szignifikánsan megváltozott gazdasejti biológiai funkciók három fő területtel hozhatók kapcsolatba, ezek a „cytokin szekréció", az „antigén feldolgozás és prezentáció", valamint az „apoptosis". A GO „sejthalál" csoport jelentősen kiterjedt funkcionális kategóriának bizonyult, a csoport mind apoptotikus, mind pedig antiapoptotikus géneket is tartalmazott. Ennek megfelelően a GO analízissel nyert másik két csoport "az apoptosist pozitívan regulálók" és az "apoptosist negatívan regulálók" is egy meglehetősen nagy csoportot alkottak. Az antagonizmust a proapoptotikus és az antiapoptotikus gének között az is tükrözte, hogy nem láttunk apoptotikus változásokat a kezelt sejtekben. A jelentős változást mutató "természetes és adaptív immunválasz" kategóriák rávilágítanak arra a tényre, hogy az emelkedő cytokin szintézisnek és antigén prezentációnak az immunválasz mindkét ágában fontos szerepe van. A **25B ábrán** kiemeltük azokat az upregulálódott szekretált géneket (szekretom) és receptorokat, amelyek befolyásolhatják az immunrendszer sejtes tagjait.

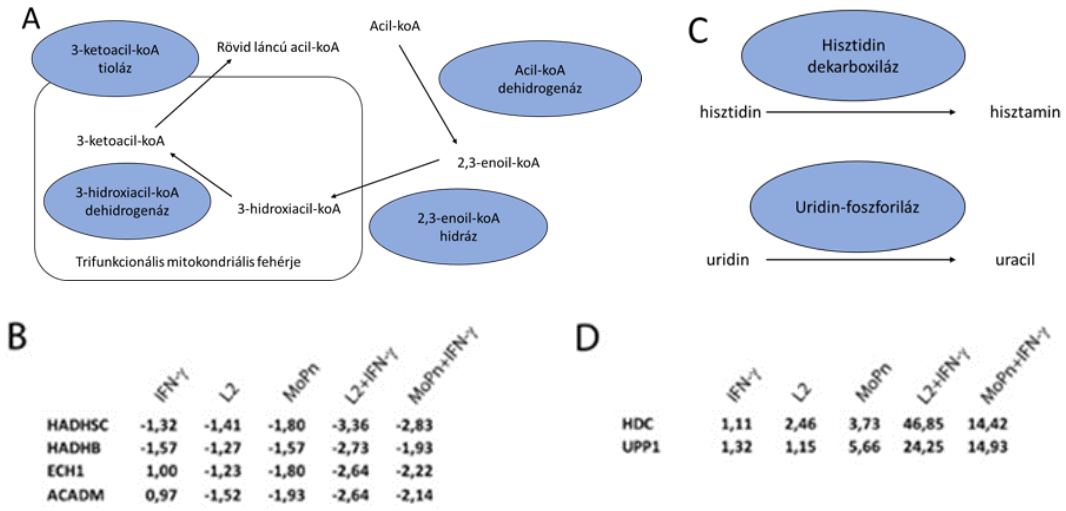


24. ábra. *Génexpressziós változások chlamydia fertőzésben IFN-γ kezelés jelenlétében vagy hiányában. A C. trachomatis L2 (**A**) és C. muridarum (MoPn) (**B**) fertőzés hatására IFN-γ jelenlétében és hiányában jelentősen megváltozott gének Venn diagramja. **C:** A különböző kezelésen átesett minták fő komponens analízise. **D:** A DNS chip adatok megerősítésére szolgáló qPCR vizsgálat eredménye. A qPCR során ugyanazokat a mintákat használtuk, mint a DNS chip analízis során. A tengelyek a qPCR génexpressziós értékeit és a microarray analízis génexpressziós eredményeit mutatják. A lineáris regressziós vonalak a két mérés közötti korrelációt tükrözik.*



25. ábra. *A chlamydia fertőzés és/vagy IFN-γ kezelés által okozott változások epithel sejtek génkifejeződésében.* ***A****: A TLR receptor és az IFN-γ jelátviteli utak chlamydia fertőzött és IFN-γ kezelt egér epithel sejtben. Az upregulált gének térképe a már ismertek alapján Pathway Studio 6.0 program használatával készült. Az upregulált gének lila színnel vannak kiemelve. A JAK-STAT kaszkád aktiválódhatott a szekretált cytokinek által autokrin parakrin módon. Az exogén IFN-γ és a chlamydia zöld színnel vannak jelölve. A chlamydia kapcsolódhat a már leírt TLR2 és TLR4 receptorokhoz és potenciálisan a TLR3 és ZBP1 mintázat felismerő receptorokhoz (szaggatott vonal). A hőtérkép a génexpresszió upregulációját mutatja az adott kezelés mellett.* ***B:*** *Az upregulálódott gének expressziójának összehasonlítása melyek potenciálisan hatással bírnak a chlamydia fertőzésre, immunitásra. A kék szín a kisfokú, a piros szín a magas fokú upregulációt mutatja.*

A downregulálódott géncsoportok a GO analízis alapján teljesen más funkcionális kategóriába tartoztak. Ezek a kategóriák a celluláris metabolizmussal, különösen a zsírmetabolizmussal, az adhézióval és az extracelluláris mátrix termelődéssel kapcsolatosak. A gazdasejti metabolikus változásokat, amelyek befolyásolhatják a chlamydia szaporodását, a **26. ábra** tartalmazza.



B

	IFN-γ	L2	MoPn	L2+IFN-γ	MoPn+IFN-γ
HADHSC	-1,32	-1,41	-1,80	-3,36	-2,83
HADHB	-1,57	-1,27	-1,57	-2,73	-1,93
ECH1	1,00	-1,23	-1,80	-2,64	-2,22
ACADM	0,97	-1,52	-1,93	-2,64	-2,14

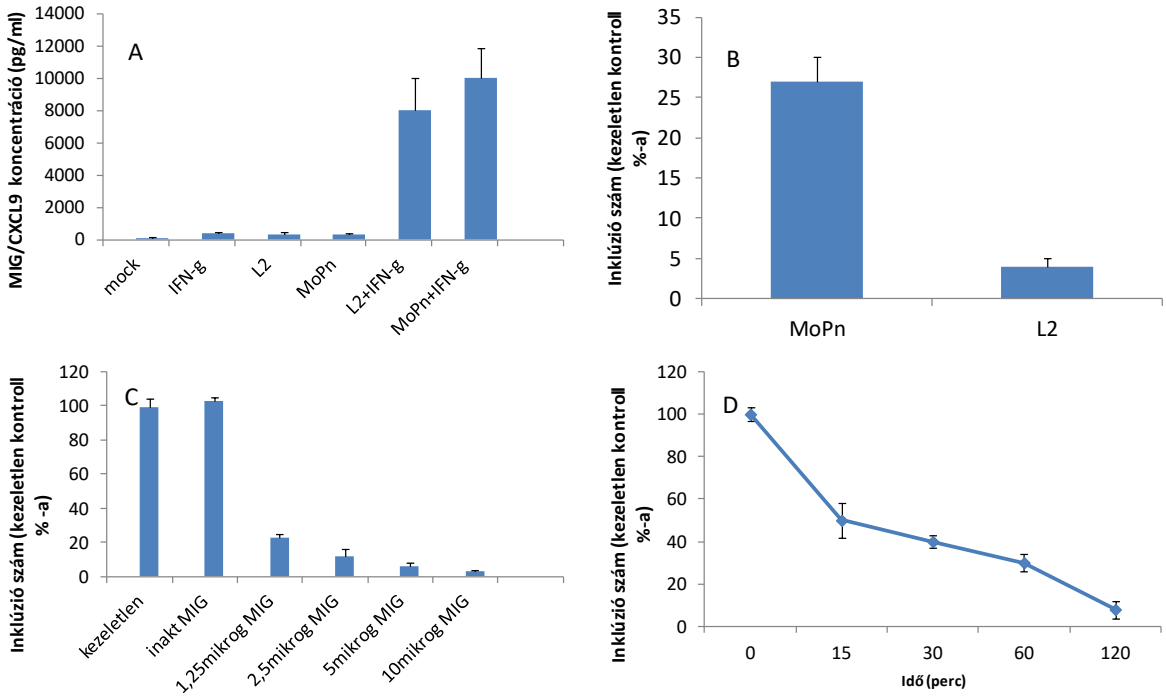
D

	IFN-γ	L2	MoPn	L2+IFN-γ	MoPn+IFN-γ
HDC	1,11	2,46	3,73	46,85	14,42
UPP1	1,32	1,15	5,66	24,25	14,93

26. ábra. *Gazdasejti metabolikus változások, melyek befolyásolhatják a chlamydia szaporodást.* ***A:*** *A downregulált zsírsav béta-oxidációs ciklus.* ***B:*** *az átlagos downreguláció a mock fertőzött mintához hasonlítva.* ***C:*** *Az upregulálódott hisztidin dekarboxiláz és uridin-foszforiláz gének.* ***D:*** *Az átlagos upreguláció a mock fertőzött mintákkal összehasonlítva. ACADM, acetil-koenzim A dehidrogenáz; ECH1, enoil-koenzim A hidratáz 1; HADHB, hidroxiacil-koenzim A dehidrogenáz/3-ketoacil-koenzim A tioláz/enoil-koenzim A hidratáz (trifunkcionális mitokondriális fehérje) béta alegység; HADHSC, L-3-hidroxiacil-koenzim A dehidrogenáz; HDC, hisztidin dekarboxiláz; UPP1, uridin-foszforiláz 1*

A MIG/CXCL9 hatása a C. trachomatis L2 és C. muridarum fertőzőképességére

A DNS microarray analízis alapján a MIG/CXCL9 mRNS expressziója erősen emelkedettnek bizonyult a fertőzött és IFN-γ kezelt egér epithel sejtekben. A DNS chip vizsgálat eredményét alátámasztotta az a tény is, hogy a MIG/CXCL9 szekretált protein elérte a 11.46 pg/ml koncentrációt a sejtfelülúszókban **(27A ábra)**. Annak kiderítésére, hogy mi lehet a MIG/CXCL9 feladata a fertőzések során, *in vitro* antibakteriális tesztben megvizsgáltuk a rekombináns egér MIG/CXCL9 hatását humán és egér chlamydia törzsekre. A két chlamydia meglehetősen különbözött egymástól a MIG/CXCL9 iránt mutatott érzékenységben. A *C. muridarum* fertőzőképességét 10 μg/ml MIG/CXCL9 26.8%-ra redukálta a kezeletlen kontrollhoz képest, ugyanakkor a *C. trachomatis* L2 típusának infektivitását lecsökkentette 1.7%-ra **(27B ábra)**. A további kísérletek azt mutatták, hogy a MIG/CXCL9 koncentráció- és időfüggő módon gátolta a *C. trachomatis* L2 szaporodását. 10 μg/ml koncentrációban alkalmazva a MIG/CXCL9-et az élő chlamydiák száma 98.7%-kal csökkent, még az általunk vizsgált legkisebb koncentráció (1.25 μg) esetén is 77%-os volt a redukció. A hőinaktivált MIG/CXCL9 nem mutatott anti-chlamydiás hatást **(27C ábra)**. A MIG/CXCL9 időbeli hatásának vizsgálata során azt kaptuk, hogy az anti-chlamydiás hatás kifejtéséhez legalább 15 perces kezelés szükséges, mely idő alatt a MIG/CXCL9 52%-kal csökkentette a *C. trachomatis* L2 infektivitását **(27D ábra)**.



27. ábra. *A MIG/CXCL9 anti-chlamydiás hatásának koncentráció- és időfüggése.* ***A:*** *A chlamydia indukálta MIG/CXCL9 termelés. Egér epithel sejteket fertőztünk C. trachomatis L2 és C. muridarum törzsekkel, és a minták egy részét IFN-γ-val kezeltük. A sejtfelülúszó MIG/CXCL9 tartalmát ELISA módszerrel határoztuk meg.* ***B:*** *A MIG/CXCL9 anti-chlamydiás hatása chlamydia törzstől függő. C. trachomatis L2 és C. muridarum EB-ket inkubáltunk együtt 10 μg MIG/CXCL9-cel.* ***C:*** *A MIG/CXCL9 anti-chlamydiás hatása dózisfüggő. C. trachomatis L2 EB-ket változó mennyiségű MIG/CXCL9-cel kezeltünk.* ***D:*** *A MIG/CXCL9 anti-chlamydiás hatása időfüggő. Az 5 μg MIG/CXCL9-cel kezelt C. trachomatis L2 EB-k infektivitását fogékony sejtre történő inokulálással mértük, majd a chlamydia inklúziók számát IF módszerrel határoztuk meg. inakt MIG= hőinaktivált MIG/CXCL9.*

Munkánk során fontos megállapítás volt, hogy az IFN-γ 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 pathogén fajt használtunk. A vártnak megfelelően a kétféle chlamydia által indukált és represszált gének meglehetősen átfedőek voltak, viszont nem teljesen azonosak **(24. ábra)**. Nagyon érdekes felfedezés, hogy az egér chlamydia egymagában alkalmazva nagyobb számú humán gén expresszióját változtatta meg, mint a humán chlamydia, ha viszont a chlamydiákat IFN-γ 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 [276], mind pedig a humán és az egér chlamydia életkörülményeinek megváltozása az IFN-γ kezelés kapcsán [53]. Mindazonátal az alapvető megállapítás, miszerint az IFN-γ a gazdasejti génexpresszió indukcióját vagy represszióját is fokozhatja, mindkét chlamydia esetében megfigyelhető volt. A fertőzött és IFN-γ kezelt sejtekben a gének szignifikáns upregulációjának az oka feltehetően a TLR, valamint az IFN-γ receptor szignalizációs utak szimultán bekapcsolása, aktiválódása. Korábban is leírták, hogy kapcsolat van a TLR-MAL/TIRAP-IRAK-NF-κB hálózat és az IFN-β-JAK-STAT hálózatok között [277]. A legfontosabb TLR-ek, amelyek részt vesznek a chlamydiák

felismerésében a TLR2 és TLR4 [278][279]. A kísérleteink során a csak chlamydia fertőzött, illetve chlamydia fertőzött és IFN-γ kezelt sejtek esetében a TLR2 szignál kaszkád különböző tagjainál láttunk upregulációt (TLR2, MyD88, I-κB, NF-κB, NF-κB által regulált gének). A TLR útvonal mellett az IFN-γ receptor upregulációja mutatta az IFN-γ receptor szignál útvonal - STAT1, STAT2, JAK2, IRF9 és SOCS1 - párhuzamos aktivációját a fertőzött és IFN-γ kezelt mintákban. Számos IFN-γ indukált és IFN-γ-val kapcsolatos gén upregulálódását tapasztaltuk még a csak fertőzött, de IFN-γ-val nem kezelt sejtekben is, beleértve különböző p47 GTPázokat (OAS1G, IFIT1, STAT2, és IRF7). Ez a fajta upreguláció azt mutatja, hogy bizonyos TLR-ek felismerik a chlamydiát (a fertőzött mintákban), és rajtuk keresztül indukálják az I. típusú IFN-eket. Bár azt találtuk, hogy a TLR3 (ez a mintázat felismerő receptor ismeri fel a duplaszálú DNS-t, és indukálja az IFN-α és -β expressziót) kifejeződése is upregulálódott, ennek a receptornak a szerepe az I. típusú IFN-ek indukálásában még kérdéses [280]. A TLR3 mellett az intracelluláris mintázat felismerő receptor, a Z-DNS kötő protein 1 (ZBP1) is meglehetősen upregulálódott a chlamydia fertőzés során. Bár ellentmondó adatok is vannak [281], a ZBP1-ről kimutatták hogy szerepet játszik a duplaszálú DNS-ek intracelluláris felismerésében és az I. típusú IFN-ek indukciójában [282]. Bár az IFN-γ befolyása a fertőzött sejtek génexpressziójának downregulációjában még kifejezettebb volt, mint az upregulációban, az ezt előidéző mechanizmusok még nem ismertek. A leginkább downregulálódott két gén a D vitamin receptor gén és a MYB gén volt. A D vitamin receptor, a D vitamin nukleáris receptora, direkt szabályozza a különböző celluláris folyamatok célgénjeit [283], a MYB pedig a központi jelentőséggel bíró, kulcs transzkripciós faktor, mely a sejtek proliferációját és differenciálódását szabályozza [284].

Kísérletünk egyik fontos eredménye az emelkedett cytokin szekréció kimutatása a fertőzött és IFN-γ kezelt sejtekben. Ezek a cytokinek és/vagy chemokinek odavonzhatják és aktiválhatják a természetes és a tanult immunválasz különböző sejt típusait. Figyelemre méltó az a tény is, hogy a különböző T-sejt chemokinek, mint pl. a MIG/CXCL9, I-TAC/CXCL11, IP10/CXCL10, MIP3a, RANTES és a CXCL16 szignifikáns upregulációja további IFN-γ termelő T-sejt infiltrációhoz vezethet, pozitív visszacsatolást okozva. A fertőzött és IFN-γ 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 cytokinek és chemokinek mellett más proinflammatorikus és fibrosist fokozó gének is indukálódtak, ide sorolhatók a komplementrendszer különböző tagjai, a prosztaglandin endoperoxidáz szintáz 2, a CTGF és a TGF-β. Az IFN-γ stimuláló hatása a proinflammatorikus citokinek expressziójára a humán chlamydia törzzsel történt fertőzés esetén nagyobb volt. A chemokin-cytokin mediálta immunaktiváció mellett az IFN-γ emelte az antigén feldolgozásban és prezentációban szerepet játszó fehérjék génkifejeződését mindkétféle chlamydia törzzsel történt fertőzést követően. Ez a funkcionális csoport magába foglalt olyan géneket, mint pl. egér MHC-I variánsokat, a β2 mikroglobulint, 7 proteosoma gént és az antigén peptid transzporter, TAP1 és TAP2 proteinek génjeit. Az a tény, hogy főleg az MHC-I úttal kapcsolatos elemek

aktiválódtak, arra a hipotézisre vezetett, hogy ezek a sejtek főleg a cytotoxikus $CD8^+$ T-lymphocytáknak képesek prezentálni az antigént. Irodalmi adatok alapján a $CD4^+$ T-sejtek fontos szerepet játszanak a chlamydia fertőzések leküzdésében [54], így további vizsgálatok szükségesek annak megállapítására, hogy a MHC-II általi $CD4^+$ T-lymphocyta indukció elmaradása chlamydia közvetítette-e.

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. Ezek a cytokinek antimikrobiális hatással rendelkeznek *E. coli*, *L. monocytogenes* és *Streptococcus pyogenes* ellen [285][286]. Továbbá emelkedett MIG/CXCL9 expressziót mértünk a *C. pneumoniae*val fertőzött egerek tüdejében, valamint mennyisége emelkedett volt az aktivált humán epithel sejtekben is [287]. Kísérleteink 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. Ennek lehetséges magyarázata, ahogy azt már korábban leírták [53], hogy a *C. muridarum* jobban adaptálódott a MIG/CXCL9-hez a természetes gazdájában, mint a humán chlamydia. Mivel a MIG/CXCL9 csak akkor mutatott antimikrobiális hatást, ha együtt inkubáltuk az EB-kkel, nem valószínű, hogy a kifejeződött MIG/CXCL9-nek hatása lenne a már fertőzött epitheliális sejtekre úgy, mint az IFN-γ-nak, a MIG/CXCL9 inkább direkt akadályozhatja meg a chlamydiák terjedését lokálisan. Különböző antimikrobiális hatással rendelkező IFN-indukált GTP-ázok szintjét is erősen upreguláltnak mértük, ahogy korábban már leírták [53] a fertőzött és IFN-γ kezelt sejtekben. További két, eddig még nem jellemzett, de potenciálisan antimikrobiális IFN-indukálható GTPáz, a GBP8 és a GBP10 kifejeződése is nagyon erősen indukálódott (157-szeres, 1351-szeres) a fertőzött és IFN-γ-val kezelt mintákban.

A kulcsfontosságú metabolitok megvonása, különösen az IFN-γ közvetített gazdasejti IDO indukálása és az ennek következtében kialakuló triptofán hiány a gazdasejt legfontosabb stratégiája, hogy megzavarja a chlamydia szaporodását [288]. Az egerekben még ez idáig nem írták le, hogy a gazdasejt mely anyagcsere útjai felelősek az anti-chamydiás hatásért. Ebből a szempontból érdekes, hogy mind az upregulálódott, mind a downregulálódott génkészlet tartalmaz olyan géneket, amelyek megváltoztathatják az alapvető gazdasejti anyagcsere folyamatokat. A GO funkcionális elemzés alapján a downregulálódott gének között béta-zsírsav-oxidáció útvonal volt a leginkább megváltozott. Kísérletünkben úgy találtuk, hogy ennek az útvonalnak a kulcsenzimei – HADHSC, HADHB, ECH1, és ACADM – downregulálódtak a chlamydia fertőzött és IFN-γ-val kezelt sejtekben. Ez az útvonal felelős a zsírsav láncok lebomlásáért, mialatt nagy mennyiségű adenozin-trifoszfát (ATP) keletkezik. Mivel a chlamydia ATP auxotrof [289], a gazdasejt csökkenő ATP készlete megváltoztathatja a chlamydia növekedését. Az upregulálódott gének tekintetében a HDC nagymértékben indukálódott a fertőzött, valamint a fertőzött és IFN-γ kezelt sejtekben; ez az enzim felelős a gazdasejtben a hisztidin proinflammatorikus hisztaminná konvertálásában. Ezen enzim termelődését már korábban leírtuk *C. pneumoniae* fertőzött egerek tüdejében [83]. Amellett,

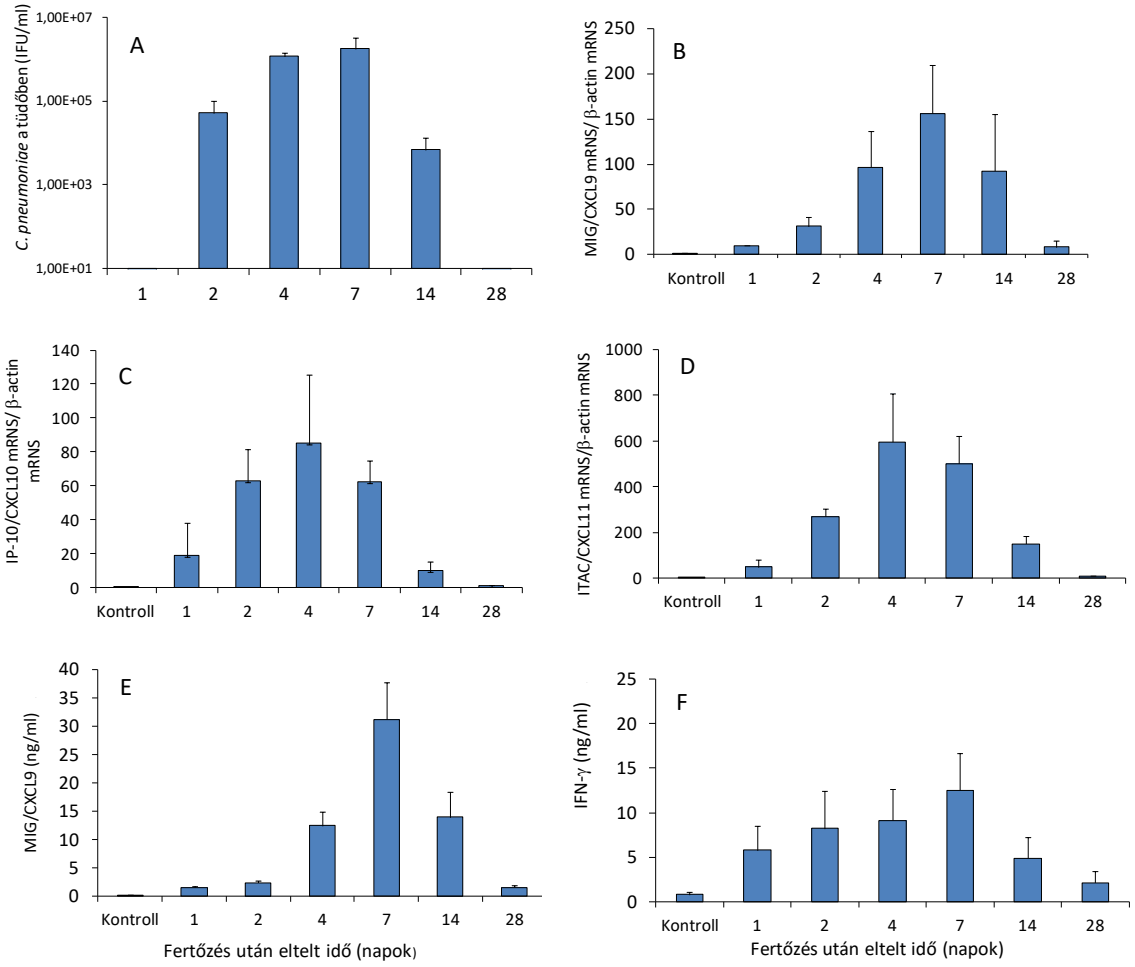
hogy a gyulladásos választ kiváltja, a megnövekedett HDC tevékenység csökkentheti is a hisztidin mennyiséget. A rendelkezésre álló intracelluláris hisztidin csökkentése hatékony stratégia lehet a gazdasejt részéről, mert a chlamydia nagyon érzékeny a hisztidin koncentrációra [290]. Az IFN-γ bekapcsolta az uridin foszforiláz (UPP) szintézist is a chlamydia fertőzött sejtekben. Ez az enzim bontja a gazdasejti uridint uracilra és ribóz-foszfátra. Az uracil tovább degradálódik más metabolikus termékekké, így a gazdasejt UTP szintje csökkenhet uridin hiányában. Ezt a feltételezést támasztja alá az a megfigyelés, hogy UPP génkiütött egerekben szignifikánsan emelkedett az uridin és az UTP szint [291]. A *C. trachomatis* nem képes UTP-t szintetizálni az uracilból; ezért a gazdasejt UTP készletére támaszkodik [250]. Érdekes, hogy az IFN-γ-ra kevésbé érzékeny egér pathogén *C. muridarum* törzs rendelkezik egy bakteriális enzimmel, az uracil-phosphoribosyltransferázzal, ami az uracil uridin-5-monophosphattá (UMP) történő konverzióját végzi, továbbá vannak enzimei az UMP–UTR szintézisre is [52], talán ez lehet az oka annak, hogy el tudják kerülni a gazda közvetítette metabolit korlátozást. Mivel az egér chlamydia kevésbé érzékeny az IFN-γ-ra egér epithel sejtekben [53][63], a direkt anti-chlamydia gének és/vagy fehérjék és a fent említett metabolikus változások valószínűleg kevésbé hatékonyak a *C. muridarum* törzs esetén, ahogy ezt már leírták a gazdasejti p47 GTP-ase esetében [53], valamint az általunk végzett MIG/CXCL9 kísérletben is ezt láttuk. Bár ezek az anyagcsereutak elméletileg gátolhatják a chlamydia növekedését, az is lehetséges, hogy ezek csak mellékes metabolikus változások, korlátozott anti-chlamydiás hatással. Ennek megfelelően ezen anyagcsere-változásoknak a pontos szerepét egyénileg kell megvizsgálni.

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

Abból a célból, hogy megtudjuk, vajon a *C. pneumoniae* fertőzés indukálja-e az ELR (glutaminsav-leucin-arginin)-CXC chemokinek termelődését, BALB/c egereket inokuláltunk *C. pneumoniae* CWL-029 törzsével. A fertőzést követő 1., 2., 4., 7., 14., és 28. napon egerek egy-egy csoportját feláldoztuk, a tüdejükből meghatároztuk a visszatenyészthető *C. pneumoniae* mennyiségét, valamint a MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10, I-TAC/CXCL11 mRNS expresszióját, és a MIG/CXCL9 és az IFN-γ protein mennyiségét. Korábbi vizsgálatainkhoz hasonlóan a visszatenyészthető *C. pneumoniae* a 14. napra nagymértékben visszaesett [214] **(28A ábra)**.

A MIG/CXCL9 mRNS expressziója már az első napra megemelkedett, a legmagasabb expressziót, 156-szorost, a fertőzést követő 7. napon mértük **(28B ábra)**. A másik két ELR-CXC chemokin, az IP-10/CXCL10 és az I-TAC/CXCL11 mRNS expressziója a MIG/CXCL9-hez hasonlóan megemelkedett már az 1. napon, de azzal ellentétben az expressziójuk a legmagasabb szintet a 4. napon érte el, ami az IP-10/CXCL10 esetében 85-szörös és az I-TAC/CXCL11 esetén pedig 579-szeresnek bizonyult **(28C, D ábra)**. A MIG/CXCL9 fehérje szinten történt kifejeződése teljesen korrelált az mRNS kifejeződéssel, a legmagasabb szintet a 7. napon mértünk **(28E ábra)**. A MIG/CXCL9 nemcsak lokálisan, hanem a keringésben is megjelent a 7. napon 360±124 pg/ml, a 14. napon pedig 798±252 pg/ml mennyiséget

mutattunk ki az egerek szérumában. Az IFN-γ koncentrációja, amely a MIG/CXCL9 termelődésének legfontosabb kiváltója, a fertőzés után közvetlenül kezdett el emelkedni, a csúcspontját viszont a 7. napon érte el 12.5 ng/ml mennyiséggel **(28F ábra)**.



28. ábra. A *C. peumoniae* fertőzés hatására bekövetkező változások a egerek tüdejében. ***(A)****: A visszatenyészthető chlamydia mennyisége. Az egerek tüdőszuszpenziójából a C. pneumoniaet HEp-2 sejten tenyésztettük, majd indirekt IF módszerrel detektáltuk az inklúziókat. A MIG/CXCL9* ***(B)****, IP-10/CXCL10* ***(C)*** *és az I-TAC/CXCL11* ***(D)*** *gének expresszió a fertőzött egerek tüdejében. A tüdőkből kivont teljes RNS-t qPCR analízis során specifikus primereket használva vizsgáltuk. Az adatokat β-aktinra normalizáltuk és a fertőzetlen egerek mintáinak expressziójához viszonyítottuk. A fertőzött egerek tüdejének MIG/CXCL9* ***(E)*** *és IFN-γ* ***(F)*** *protein tartalma, melyeket ELISA módszerrel határoztunk meg.*

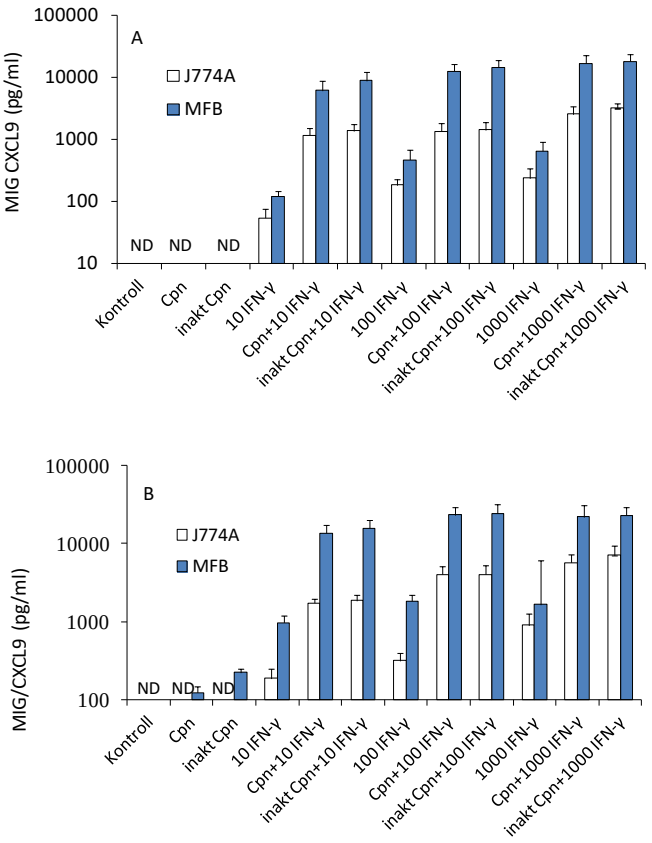
A C. pneumoniae fertőzés indukálja a MIG/CXCL9 termelődését in vitro sejtkultúrákban

Annak tisztázására, hogy a *C. pneumoniae* képes-e stimulálni a MIG/CXCL9 termelődését *in vitro* körülmények között, macrophág eredetű J774A, valamint a laboratóriumunkban egér embriókból tripszinezéssel előállított fibroblaszt sejtkultúrákat fertőztünk *C. pneumoniae* CWL-029 törzsével, és a felülúszóból meghatároztuk a MIG/CXCL9 tartalmat ELISA módszerrel. A fertőzést követő 24 órában nem tudtunk kimutatni MIG/CXCL9 produkciót egyik sejtkultúrában sem **(29A ábra)**. A *C. pneumoniae* azonban a 2. naptól indukálta a MIG/CXCL9 szekrécióját (122.7±22.3 pg/ml) az egér fibroblasztokban **(29B ábra),** a J774A MIG/CXCL9

termelése viszont csak a fertőzést követő 3. napon indult meg (156.9±56.7 pg/ml). A hőinaktivált chlamydia preparátum hasonló szintű MIG/CXCL9 termelést váltott ki mindkét sejtvonalban, mint az élő *C. pneumoniae*.

In vivo egérkísérletünkben azt tapasztaltuk, hogy a *C. pneumoniae* fertőzést követően jelentősen megemelkedett a MIG/CXCL9 termelődését indukáló IFN-γ szintje. Ezért az *in vitro* kísérletünk során megvizsgáltuk az IFN-γ és a *C. pneumoniae* együttes hatását, a sejtkultúrákat különböző mennyiségű IFN-γ-val (10, 100 vagy 1000 U/ml), valamint *C. pneumoniae*val kezelve. A kettős kezelés mindkét sejtkultúrában az első naptól kezdve dózisfüggő módon fokozta a MIG/CXCL9 termelődését. A fibroblaszt sejtkultúrában a *C. pneumoniae* fertőzés jelentősen fokozta az IFN-γ hatását, 10 U/ml alkalmazott koncentráció mellett 25.8-szoros emelkedést láttunk 100 U/ml adagolásával 27-szeres, 1000U/ml IFN-γ-val történt kezelés a MIG/CXCL9 termelődését 51.8-szorosára növelte a csak IFN-γ-val kezelt sejtkultúrák MIG/CXCL9 expressziójához képest. A MIG/CXCL9 szekréció hasonlóan fokozott volt abban az esetben is, ha az élő *C. pneumoniae* helyett hőinaktivált *C. pneumoniae*t alkalmaztunk a kísérlet során: 10, 100 és 1000 U/ml IFN-γ 25.8, 31.5 és 75-szörösére fokozta a MIG/CXCL9 termelődését a fertőzést követő 24 óra után a csak különböző mennyiségű IFN-γ-val kezelt sejtkultúrákhoz képest.

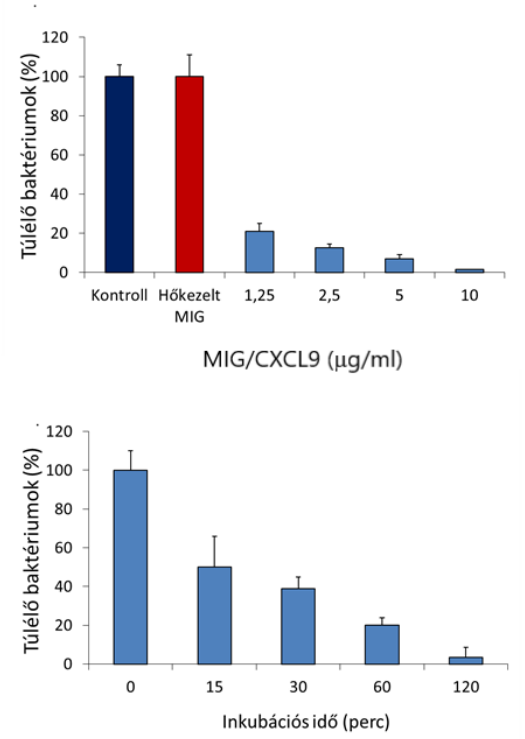
A macrophág eredetű J774A sejtekben a *C. pneumoniae* és a 10, 100 vagy 1000 U/ml IFN-γ kezelés 10.8, 7.4 és 21.6-szoros MIG/CXCL9 szint emelkedést okozott a fertőzést követő 24 órában azon sejtekhez viszonyítva, melyek csak különböző mennyiségű IFN-γ-val lettek kezelve. A MIG/CXCL9 produkció fokozódása a macrophág eredetű sejtekben a fibroblaszthoz hasonlóan akkor is megnövekedett, ha hőinaktivált *C. pneumoniae*val és 10, 100 és 1000 U/ml IFN-γ-val kezeltük a sejteket. Az emelkedő IFN-γ dózisnak megfelelően 13.3, 8.7 és 25.3-szoros termelődést kaptunk a fertőzést követő 24 órával a csak IFN-γ-val kezelt macrophágokhoz képest. A fent említésre került összes tenyésztési, kezelési körülmény esetén az egér fibroblaszt sejtek szignifikánsan több MIG/CXCL9-et termeltek, mint a J774A (P<0.05) **(29A ábra)**. Hasonló eredményeket kaptunk az összes kezelési forma esetén a fertőzést követő 48 óra után is **(29B ábra)**. Egy további kísérletünkben azt tapasztaltuk, hogy a betegből izolált cardiális eredetű *C. pneumoniae* CV6 és annak hőinaktivált formája is indukálta a MIG/CXCL9 termelődését az egér fibroblasztokban és a macrophág eredetű J774A sejtvonalban a fertőzést követő 48 és 72 óra múlva.



29. ábra. *A C. pneumoniae fokozott MIG/CXCL9 termelése J774A és egér fibroblaszt (MFB) sejtekben IFN-γ jelenlétében. A sejtkultúrákat C. pneumoniaeval fertőztük vagy inaktivált formájával kezeltük különböző mennyiségű IFN-γ jelenlétében (10, 100, vagy 1000 U/ml). Kezeletlen J774A és egér fibroblaszt sejtek (MFB) szolgáltak kontrollként. 24* ***(A)*** *és 48* ***(B)*** *órát követően. ND: nem volt detektálható. Az egér fibroblasztok minden kombinációban és időpontban szignifikánsan több MIG/CXCL9-et termeltek, mint a J774A sejtek. P*<0.05

A MIG/CXCL9 hatása a C. pneumoniae fertőzőképességére

A MIG/CXCL9 termelődésének okát, illetve funkcióját kutatva kíváncsiak voltunk, hogy hasonlóan a *C. trachomatis* L típusához, a MIG/CXCL9 rendelkezik-e *C. pneumoniae* ellenes hatással is (amit a korábbiakban már leírtunk). Ennek bizonyítására *in vitro* antimikrobiális vizsgálatot terveztünk, melynek során a chlamydia EB-ket együtt inkubáltuk különböző mennyiségű rekombináns MIG/CXCL9 proteinnel. A koinkubáció a MIG/CXCL9 dózisdependens antibakteriális aktivitását mutatta. A MIG/CXCL9 10 μg/ml koncentrációja esetén, a visszatenyészthető *C. pneumoniae* inklúziók számát 98.4%-kal redukálta, és a még az általunk használt legkisebb dózis (1.25 μg/ml) is 79%-os csökkenést eredményezett. A hőkezelt rekombináns MIG/CXCL9 nem mutatott anti-chlamydiás hatást **(30A ábra)**. A MIG/CXCL9 anti-chlamydiás hatásának idő kinetikáját vizsgálva azt találtuk, hogy a *C. pneumoniae* fertőzőképességének 50%-os csökkentéséhez a chlamydia EB-knek és a MIG/CXCL9-nek legalább 15 perces koinkubációja szükséges **(30B ábra)**. Az általunk vizsgált másik két ELR-chemokin, az IP-10/CXCL10 és az I-TAC/CXCL11 10 μg/ml koncentrációban együtt inkubálva a *C. pneumoniae* EB-kkel nem mutattak anti-chlamydiás hatást.



30. ábra. *A MIG/CXCL9 anti-chlamydiás hatásának koncentráció- és időfüggése.* ***A:*** *C. pneumoniae EB-ket inkubáltunk különböző koncentrációjú MIG/CXCL9-cel.* ***B:*** *A C. pneumoniae EB-ket különböző ideig inkubáltuk együtt 5 µg MIG/CXCL9-cel. A MIG/CXCL9 kezelt chlamydiát HEp-2 sejtet használva tenyésztettük vissza, majd a chlamydia EB-k mennyiségét IF tesztben határoztuk meg.*

A MIG/CXCL9 kötődésért felelős chlamydia ligand azonosítása

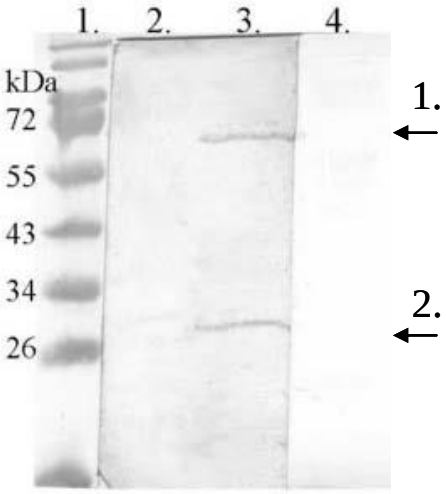
Kísérleteink során fontosnak tartottuk azonosítani azt a chlamydia fehérjét, amely a MIG/CXCL9 megkötésében játszik szerepet. Ennek érdekében Far Western blot kísérletet terveztünk, melynek során koncentrált *C. pneumoniae* EB-ket és az ugyanazon előállítási folyamaton átesett fertőzetlen sejteket tartalmazó mock preparátumot SDS-PAGE segítségével szeparáltuk, majd a kapott fehérjéket filterre vittük (blotoltuk) és rekombináns MIG/CXCL9-cel kezeltük. Ezt követően a lekötődött chemokint HRP-konjugált anti-MIG/CXCL9 ellenanyaggal inkubáltuk, majd a szubsztrát hozzáadásával láthatóvá tettük a specifikus kötődést. Negatív kontrollként olyan *C. pneumoniae* minta szerepelt, melyet nem kezeltünk rekombináns MIG/CXCL9-cel, csak HRP-konjugált anti-MIG/CXCL9 ellenanyaggal.

A rekombináns egér MIG/CXCL9 a chlamydia lizátum egy 60 és egy 30 kD-os proteinjéhez kötődött **(31A ábra)**. A rekombináns MIG/CXCL9 nem mutatott kötődést a mock lizátumhoz, és a chlamydia lizátumhoz önmagában nem kötődött a hozzáadott HRP-konjugált anti-MIG/CXCL9. A poliakrilamid gélből a MIG/CXCL9 kötődésnek megfelelő 60 és 30 kDa tömegű fehérje csíkokat kivágtuk, és további vizsgálat céljából tömegspektrometriás (LC-MSMS) vizsgálatnak vetettük alá. Az LC-MSMS analízis eredményeként azonosítottuk azokat a chlamydia fehérjéket, amelyek felelősek a MIG/CXCL9 kötődéséért. Az analízis során két 60 kDa-os és egy 30 kDa-os chlamydia fehérje került azonosításra **(31B ábra)**. Azonosítottunk egy 60 kDa tömegű cisztein-gazdag proteint (OmcB illetve Omp2 néven is szerepel az irodalomban), mely a *C. pneumoniae* EB-k fontos felszíni proteinje és a heparin molekulák lehorgonyozására alkalmas [292]. A 60 kDa tömegű teljes OmcB fehérjén kívül azonosítottuk

a 30 kDa-os degradált formáját is. A harmadik identifikált fehérje a *C. pneumoniae* GroEL proteinje volt.

Annak bizonyítására, hogy a MIG/CXCL9 nemcsak a denaturálódott fehérjéhez tud kötődni, ahogy azt a Far Western blot során tapasztaltuk, áramlási citometria analízist végeztünk. A **32B ábrán** jól látható, hogy a rekombináns MIG/CXCL9-cel inkubált élő *C. pneumoniae* EB-k megkötötték a PE-konjugált anti-MIG/CXCL9 ellenanyagot. A MIG/CXCL9 chemokinnel nem kezelt *C. pneumoniae* EB-k nem festődtek a PE-konjugált anti-MIG/CXCL9 ellenanyaggal **(32C ábra)**.

A.



B.

putative GroEL protein [C. pneumoniae]

```
  1 MAAKNIKYNE EARKKIHKGV KTLAEAVKVT LGPKGRHVVI DKSFGSPQVT
 51 KDGVTVAKEI ELEDKHENMG AQMVKEVASK TADKAGDGTT TATVLAEAIY
101 SEGLRNVTAG ANPMDLKRGI DKAVKVVVDE LKKISKPVQH HKEIAQVATI
151 SANNDSEIGN LIAEAMEKVG KNGSITVEEA KGFETVLDVV EGMNFNRGYL
201 SSYFSTNPET QECVLEDALI LIYDKKISGI KDFLPVLQQV AESGRPLLII
251 AEEIEGEALA TLVVNRLRAG FRVCAVKAPG FGDRRKAMLE DIAILTGGQL
301 VSEELGMKLE NTTLAMLGKA KKVIVTKEDT TIVEGLGNKP DIQARCDNIK
351 KQIEDSTSDY DKEKLQERLA KLSGGVAVIR VGAATEIEMK EKKDRVDDAQ
401 HATIAAVEEG ILPGGGTALV RCIPTLEAFL PMLANEDEAI GTRIILKALT
451 APLKQIASNA GKEGAIICQQ VLARSANEGY DALRDAYTDM IDAGILDPTK
501 VTRSALESAR SIAGLLLTTE ALIADIPEEK SSSAPAMPSA GMDY
```

60 kDa Cysteine-Rich OMP/ OmcB/ OMP2 [C. pneumoniae]

```
  1 MSKLIRRVVT VLALTSMASC FASGGIEAAV AESLITKIVA SAETKPAPVP
 51 MTAKKVRLVR RNKQPVEQKS RGAFCDKEFY PCEEGRCQPV EAQQESCYGR
101 LYSVKVNDDC NVEICQSVPE YATVGSPYPI EILAIGKKDC VDVVITQQLP
151 CEAEFVSSDP ETTPTSDGKL VWKIDRLGAG DKCKITVWVK PLKEGCCFTA
201 ATVCACPELR SYTKCGQPAI CIKQEGPDCA CLRCPVCYKI EVVNTGSAIA
251 RNVTVDNPVP DGYSHASGQR VLSFNLGDMR PGDKKVFTVE FCPQRRGQIT
301 NVATVTYCGG HKCSANVTTV VNEPCVQVNI SGADWSYVCK PVEYSISVSN
351 PGDLVLHDVV IQDTLPSGVT VLEAPGGEIC CNKVVWRIKE MCPGETLQFK
401 LVVKAQVPGR FTNQVAVTSE SNCGTCTSCA ETTTHWKGLA ATHMCVLDTN
451 DPICVGENTV YRICVTNRGS AEDTNVSLIL KFSKELQPIA SSGPTKGTIS
501 GNTVVFDALP KLGSKESVEF SVTLKGIAPG DARGEAILSS DTLTSPVSDT
551 ENTHVY
```

truncated form of outer membrane protein 2/ OmcB/ OMP2 [C. pneumoniae]

```
  1 IGKKDCVDVV ITQQLPCEAE FVSSDPETTP TSDGKLVWKI DRLGAGDKCK
 51 ITVWVKPLKE GCCFTAATVC ACPELRSYTK CGQPAICIKQ EGPDCACLRC
101 PVCYKIEVVN TGSAIARNVT VDNPVPDGYS HASGQRVLSF NLGDMRPGDK
151 KVFTVEFCPQ RRGQITNVAT VTYCGGHKCS ANVTTVVNEP CVQVNISGAD
201 WSYVCKPVEY SISVSNPGDL VLHDVVIQDT LPSGVTVLEA PGGEICCNKV
251 VWRIKEMCPG ETLQFKLVVK AQVPGRFTNQ VAVTSESNCG TCTSCAETTT
301 HWKGLAATHM CVLDTNDPIC VGENTVYRIC VTNRGSAEDT NVSLILKFSK
351 ELQPIASSGP TKGTISGNTV VFDALPKLGS KESVEFSVTL KGIAP
```

31. ábra. *A MIG/CXCL9 és a C. pneumoniae kölcsönhatása.* ***A****: MIG/CXCL9 kötéséért felelős ligand azonosítása Far Western blot analízissel. A C. pneumoniae és a mock preparátumokat SDS-PAGE segítségével szeparáltuk, blotoltuk, majd a membránt MIG/CXCL9-cel, és HRP-konjugált anti-MIG/CXCL9 IgG-vel kezeltük. 1.: molekulasúly marker, 2.: mock preparátum, 3.: chlamydia EB MIG/CXCL9-cel és HRP-conjugált anti-MIG/CXCL9-cel kezelve, 4.: chlamydia EB csak HRP-conjugált anti-MIG/CXCL9-cel kezelve.* ***B****: A MIG/CXCL9 kötéséért felelős ligand azonosítása LC-MSMS módszerrel. A proteint meghatározó fragmensek aláhúzva láthatók.*

32. ábra. *A MIG/CXCL9 és C. pneumoniae interakció kimutatása áramlási citometriával.* ***A:*** *Kezeletlen nem festett chlamydia partikulák* ***B:*** *MIG/CXCL9 proteinnel és PE-jelölt anti-MIG/CXCL9-cel festett C. pneumoniae EB-k* ***C:*** *Csak PE-jelölt anti-MIG/CXCL9-cel festett chlamydia EB-k.*

A velünk született vagy más néven természetes immunválasz a legfontosabb módja a baktériumok hatékony eliminálásának a tüdőből [293]. 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, beleértve a molekulasúlyt, a diszulfid kötéseket, kationos töltést neutrális pH-n és azt, hogy az IFN-γ indukálja a termelődésüket. Az is közös a defenzinek és néhány chemokin esetén, hogy antimikrobiális hatással rendelkeznek [285]. A természetes immunválasz sokkal hatékonyabb, ha bizonyos Th1-es cytokinek, pl. az IL-12 és az IFN-γ jelen vannak [294][295]. A Th1-es immunválasz elengedhetetlen az intracelluláris pathogének elleni harcban [296]. Kísérleteink során igazoltuk, hogy a *C. pneumoniae* fertőzés *in vitro* és *in vivo* is indukálja a MIG/CXCL9 expresszióját. Ezen felül azt is bizonyítottuk, hogy a MIG/CXCL9 anti-chlamydiás hatással rendelkezik. *C. pneumoniae* fertőzés során a MIG/CXCL9 legfontosabb stimulátorának, az IFN-γ-nak a termelődés kinetikáját már korábban leírtuk [83]. A MIG/CXCL9 mRNS expressziós kinetikája követte a fertőzés során visszatenyészthető chlamydia EB-k számának változását, vagyis a MIG/CXCL9 kifejeződés akkor volt a legmagasabb, amikor a legtöbb visszatenyészthető chlamydiát mértük az egér tüdő felülúszókban, 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. Az IP-10/CXCL10 és az I-TAC/CXCL11 mRNS kifejeződése eltérően a MIG/CXCL9 mRNS kifejeződésétől a 4. napon érte el a csúcspontját, ezen eredményünk megegyezik Maxion és Kelly által leírtakkal, akik a felső genitalis traktust érintő *C. trachomatis* fertőzést követően a 4. napon mérték a legmagasabb IP-10/CXCL10 szintet az egerekben. Protein szinten a MIG/CXCL9 szintén a 7. napon jelent meg a legmagasabb mennyiségben, nem véletlen, hiszen ekkor volt a legtöbb chlamydia az egerek tüdejében. A Th1-es cytokinek közé tartozó IFN-γ rendkívül fontos szerepet játszik az akut chlamydia fertőzések leküzdésében és a perzisztens fertőzés létrehozásában [297]. Az IFN-γ továbbá fontos regulátoros szerepet

is játszik a chlamydiák elleni védelemben azáltal, hogy megváltoztatja a Th1/Th2 egyensúlyt. Ennek megfelelően az IFN-γ génkiütött egerekben a Th2-es típusú cytokinek okozta immunpathológiai változások disszeminálódó chlamydia fertőzéssel jártak együtt [298]. Elképzelhető, hogy a növekvő antimikrobiális hatás az oxigén independens baktericid mechanizmusoknak köszönhető, melybe beletartozik az IFN-γ és az ELR-chemokinek hatása is. Várhatóan a chemokint szekretáló sejtek közvetlen mikrokörnyezetében még magasabb chemokin koncentráció alakul ki, valamint a chemokin nemcsak egyedül lehet felelős az antimikrobiális hatásért, hanem hatása kombinálódhat, összeadódhat más chemokinek hatásaival. Nagyon fontos tény, hogy a MIG/CXCL9 nem kompartmentalizált módon csak a tüdőben jelent meg, mivel a *C. pneumoniae* fertőzést követően kimutattuk a 7. és 14. napon is a vérben. Hasonló módon más fertőzésben, így *Burkholderia pseudomallei* fertőzés során emelkedett MIG/CXCL9 szintet mértek humán plazmában [299].

Kísérleteink során azt találtuk, hogy *in vitro* körülmények között a *C. pneumoniae* a fertőzést követő 2. naptól indukálta az egér fibroblasztok MIG/CXCL9 termelését, míg a macrophág eredetű J774A sejtvonal MIG/CXCL9 termelése a 3. naptól indult meg. Ezzel a kísérlettel kapcsolatban az is nagyon érdekesnek bizonyult, hogy a fibroblasztok több MIG/CXCL9-et termeltek, mint a macrophág eredetű sejtek **(29. ábra).** Az is meglepő eredmény, hogy a fibroblasztokban 24 órával a *C. pneumoniae* fertőzést követően nem indukálódott a MIG/CXCL9 kifejeződés, viszont 10 U IFN-γ-val kezelve a fertőzött sejtet a MIG/CXCL9 kifejeződés az 51.8-szorosára emelkedett a csak 10 U IFN-γ-val kezelt fibroblasztokhoz képest. A *C. pneumoniae* egyfajta kostimulációs szignált indukált a mintázat felismerő receptorokon keresztül, mely az IFN-γ-val együtt fokozta a MIG/CXCL9 kifejeződését. Az a megfigyelésünk, hogy a hőinaktivált *C. pneumoniae* és az IFN-γ együttes alkalmazása 75-szörösre fokozta a MIG/CXCL9 expressziót a csak egymagában IFN-γ-val kezelt sejtekhez képest, arra utal, hogy a hőstabil chlamydia LPS lehet a feltételezett komponens, ami a MIG/CXCL9 stimulációt kiváltja. A respiratorikus eredetű *C. pneumoniae* törzs mellett a cardiovasculáris eredetű CV6 törzs is stimulálta a MIG/CXCL9 termelődését a kísérleteinkben.

Munkánk során demonstráltuk továbbá, hogy a rekombináns MIG/CXCL9 dózisdependens módon gátolta a *C. pneumoniae* szaporodását. Az irodalomban leírták, hogy a MIG/CXCL9 és az IP-10/CXCL10 antibakteriális hatással bírnak *E. coli* és *L. monocytogenes* esetén [285]. Az is nemrégen látott napvilágot, hogy a CXCL9, CXCL10 és a CXCL11 elpusztítja a *S. pyogenes*t. Figyelemre méltó, hogy gyulladásos körülmények között az epitheliális sejtek *in vivo* és *in vitro* is baktericid koncentrációban termelik a MIG/CXCL9-et [300]. A MIG/CXCL9 szerepe a bakteriális fertőzések során azonban nem ennyire egyértelmű. A fent említett pozitív példa mellett másfajta eredmények is születtek. A *Finegoldia magna* esetében a MIG/CXCL9 nem mutatott antibakteriális hatást, sőt a baktérium rendelkezik egy SufA nevű enzimmel, amely képes elhasítani, így inaktiválni a MIG/CXCL9-et [301]. 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

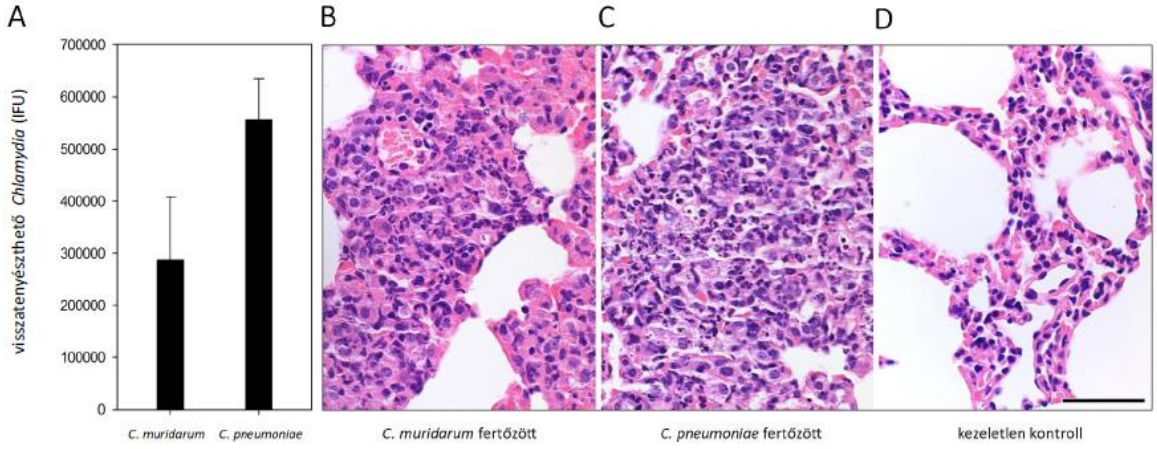
régiójában a chemokin koncentrációnak magasabbnak kell lennie. Már csak azért is magasabbnak kell lennie, mert a MIG/CXCL9 nagy affinitást mutat a heparinhoz. A glükózaminoglikánnal (GAG) kialakult kapcsolat a MIG/CXCL9-et az epitheliális felszínen tarthatja, tovább emelve a lokális koncentrációját. A GAG-ok egyfajta kemotaktikus grádiensként is szolgálnak a fehérvérsejtek vonzásában a gyulladás során [286][302]. Mivel a MIG/CXCL9 csak akkor mutatott anti-chlamydiás hatást, ha legalább 15 percig együtt inkubáltuk a chlamydia EB-kkel, valószínűsíthetjük, hogy a MIG/CXCL9 nem mutat antimikrobiális hatást a már megfertőződött epitheliális sejtekben, inkább az EB-k terjedését akadályozza meg az extracelluláris térben.

Tömegspektrometriás vizsgálat segítségével háromféle chlamydia proteint azonosítottunk, amelyek szerepet játszhatnak a MIG/CXCL9 megkötésében. A MIG/CXCL9 kötődött az OmcB proteinhez, melyet korábban a chlamydia külső membrán protein komplexének fő fehérjéjeként azonosítottak, és amely meglehetősen konzervált molekula az összes chlamydiában [303]. Régebben úgy gondolták, hogy nagyon szoros a kapcsolata a külső membrán komplexszel. Mások szerint viszont rezisztens a tripszines emésztésre, ami azt sugallja, hogy mégsem jelenik meg nyilvánvalóan a baktérium felszínén [304]. Moelleken és Hegemann [305] azonban olyan élesztőgomba adhéziós rendszert hoztak létre, melyben tanulmányozható az OmcB-prezentáló élesztősejt kötődése a humán sejtekhez. A kísérletben azt találták, hogy a *C. pneumoniae*ból származó OmcB fehérje fokozza az adhéziót a HEp-2 sejtekhez. Azt is fontos ugyanakkor megjegyezni, hogy az OmcB erőteljes ellenanyagválaszt indukál, ami arra utal, hogy a protein elérhető a humorális immunválasz számára, tehát mégis valószínűsíthetjük, hogy a felszínen kell elhelyezkednie [306][307]. Ha az OmcB a felszínen található, akkor pedig a MIG/CXCL9 hozzá tud kötődni. Ezt az elgondolásunkat az is támogatja, hogy a teljes 60 kDa-os fehérjén kívül az LC-MSMS vizsgálattal azonosítottuk a protein egy degradált/intermedier változatát is, egy 30 kDa-os fehérje formájában. Valószínűsíthetjük, hogy ez az intermedier 30 kDa-os molekula a denaturációs folyamatok eredményeként vált elérhetővé a teszt során. Eredményeink összecsengenek azzal, hogy a MIG/CXCL9 affinitást mutat a heparin molekulákhoz [302]. Az emlős sejtek felszínén található heparinszerű struktúrák, mint pl. a GAG-ok fontos szerepet játszanak a baktériumokkal kialakuló interakciókban és a chlamydia OmcB proteint is kötik [305]. Más baktérium, pl. a *S. pyogenes* esetén azt találták, hogy az M1, a fő felszíni fehérjéje – mely szükséges a baktérium epithel sejt GAG-hoz való adhéziójában – emelkedett MIG/CXCL9 termelést indukál [308]. A tömegspektometriás vizsgálattal azonosított harmadik protein, a *C. pneumoniae* GroEL proteinjének véleményezett fehérje, mely fehérje lévén dajkafehérje intracelluláris elhelyezkedésű. Wuppermann és munkatársai [309] azonban beszámoltak arról, hogy a GroEL1 az EB-ek felszínen jelenik meg, és így nem lehet kizárni, hogy a MIG/CXCL9 esetlegesen a GroEL1-hez kötődött. Mivel a kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a MIG/CXCL9 nemcsak a teljes OmcB-hez hanem annak intermedier, 30 kDa-os változatához is kötődött, valamint az OmcB fehérje szerepét a chlamydia fertőzés kezdeti szakaszában már leírták, azt valószínűsítjük, hogy a MIG/CXCL9 partner molekulája az OmcB fehérje. Áramlási citometria

analízissel bizonyítottuk továbbá, hogy a MIG/CXCL9 nemcsak a denaturált proteinhez, hanem az élő EB-ekhez is képes kötődni.

A C. muridarum indukálta antimikrobiális jelátviteli utak jellemzése egerekben

Az intracelluláris chlamydia ellen a sejtek antimikrobiális jelátviteli utakat aktiválnak a kórokozó elimimálására. A humán sejtekben a *C. trachomatis* ellen főként az IDO 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 *in vitro* körülmények között az IDO nem aktiválódik, helyette az antimikrobiális GTPázok játszanak szerepet a chlamydia elpusztításában [53]. Kísérleteink célja volt az egerekben működő, a chlamydia ellenes védelmüket szolgáló gének megtalálása. Munkánk során az állatmodellünkben különböző fertőző dózist alkalmaztunk a *C. muridarum* (1×10^3 IFU) és a *C. pneumoniae* (4×10^5 IFU) esetén, ennek oka, hogy előzetes vizsgálatainkban az egerek sokkal érzékenyebbnek bizonyultak *C. muridarum* fertőzésre, így alacsonyabb fertőző dózis szükséges, hogy ugyanolyan hisztopatológiai elváltozásokat okozzon, mint a *C. pneumoniae* [83] [214]. Ennek megfelelően kísérletünkben a fertőzött BALB/c egerek tüdejében a visszatenyészthető *C. muridarum* és a *C. pneumoniae* IFU száma hasonló volt a fertőzést követő 7. napon **(33A ábra).** Mindkét fertőzés lymphoid hiperpláziát váltott ki, lymphoid, plazmocytoid sejtek és macrophágok intersticiális felhalmozódásával a megvastagodott hörgőfalakban. A szövettani kép megfelelt az indukálható bronchus-asszociált nyirokszövet (iBALT) formának. A fertőzés ezen időpontjában a neutrophil sejtek jelenléte csak kisfokú volt, a leukocyták fő populációit a lymphocyták és a macrophágok **(33B, C ábra)** alkották. A kontroll tüdőszövet metszeten vékony alveoláris falak látszottak gyulladásos sejtek nélkül **(33D ábra).**



33. ábra. *A chlamydia fertőzés és a chlamydia indukált hisztopatológiai kép BALB/c egerek tüdőszövetében. A visszatenyészthető IFU-k C. muridarum fertőzött és C. pneumoniae fertőzött egerek tüdejéből a fertőzés utáni 7. napon* ***(A)****. C. muridarum fertőzött* ***(B)*** *és C. pneumoniae fertőzött* ***(C)*** *és nem fertőzött* ***(D)*** *tüdőszövetek H&E festve. A mérték: 50 µm.*

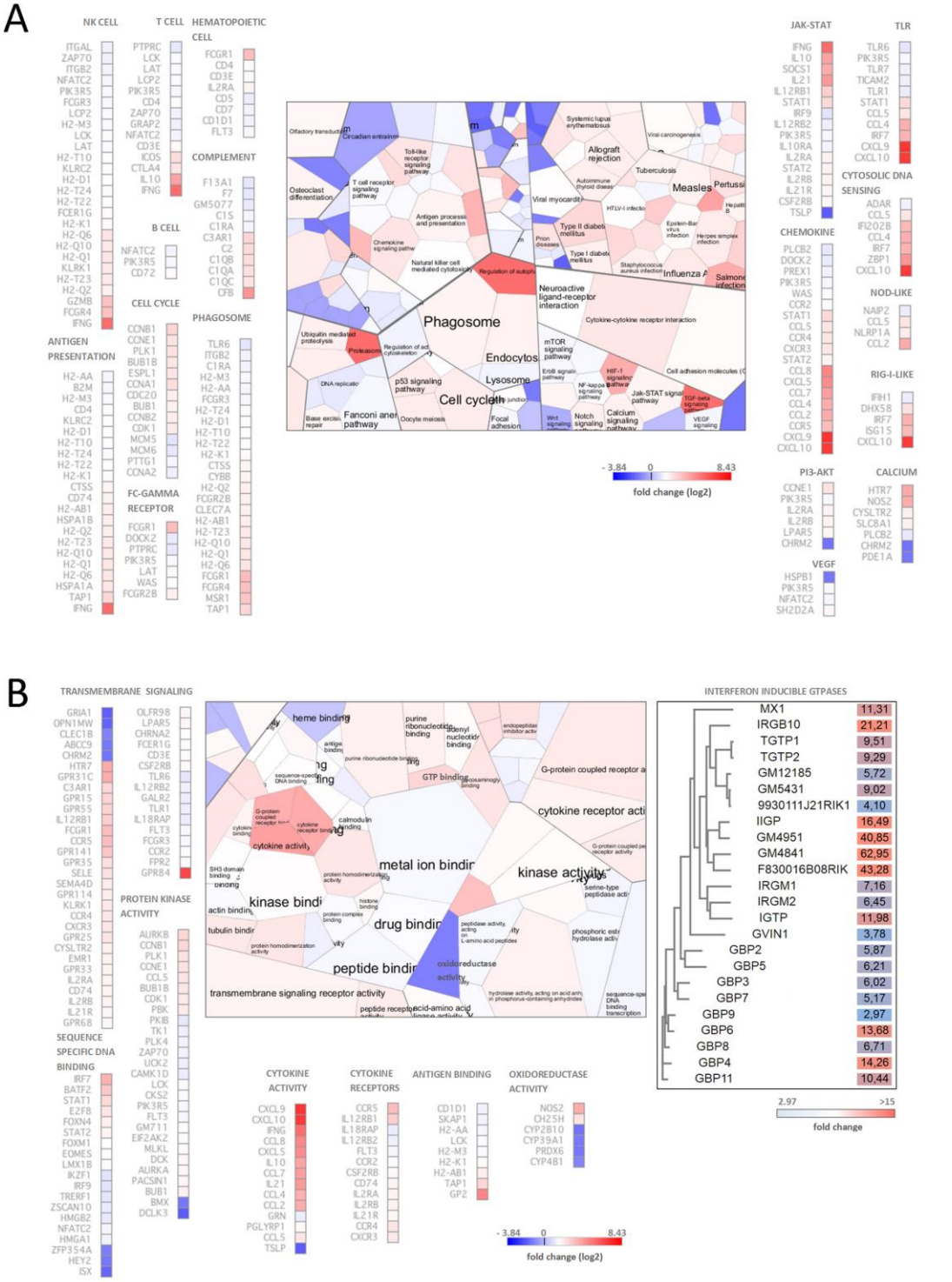
A C. muridarum fertőzött egértüdő génexpressziós változásai

Az egér chlamydia törzs által szöveti szinten indukált globális génexpressziós változások feltárására 7 nappal a fertőzés után Illumina új generációs RNS szekvenálást végeztünk fertőzött BALB/c egerek tüdőszöveteiből. Az RNS-seq analízis kimutatta, hogy 755 egér gén expressziója magasabb, 251 gén expressziója viszont alacsonyabb szintű volt, mint a nem fertőzött kontrollokban. Az upregulálódás mértéke és az upregulálódott gének száma magasabb volt (1.48–345-szeres), mint a downregulálódott gének esetén (1.5–14.36-szoros). A leginkább upregulálódott gén a CXCL11 (I-TAC) volt, de számos cytokin/chemokin gén tartozott ebbe a csoportba, beleértve a CXCL9-t (MIG), a CXCL10-et (IP-10), a CCL8-at (MCP2), a CCL2-t (MCP-1), az IFN-y-t, az IL-21-et, az IL-10-et, valamint a védelemben szerepet játszó géneket; az IRG1-et, az IIGP-t és az IDO1-et. A leginkább downregulólódott gén a BC023719 cDNS szekvencia volt (14.36-szoros), a downregulálódott gének funkció tekintetében nagy változatosságot mutattak.

A különböző mértékben expresszálódott gének Voronto módszerrel történő funkcionális elemzése számos KEGG-utat (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) tárt fel, amelyek kapcsolatban állnak a chlamydia indukálta gyulladással és az anti-chlamydiás veleszületett és adaptív védekező válasszal **(34A ábra).** Számos upregulálódott gént találtunk, amelyek a sejttípus-specifikus KEGG útvonalakhoz társulnak, például a T-sejt, a B-sejt, az NK-sejt és a hematopoietikus sejt specifikus utak, jelezve ezen leukocyták bejutását a fertőzött tüdőszövetekbe. Ennek megfelelően fokozott kifejeződést mértünk különböző sejtspecifikus gének és CD markerek esetén, például a T-sejt markerek: CD3, CD4, CD5, CD6, CD7, CD226; B-sejt markerek: CD5, CD7; DC marker: CD4; NK sejt markerek: CD4, CD7; NK lektinszerű receptorok: KLRA2, KLRB1F, KLRK1, KLRI2, KLRC2, KLRD1 és a macrophág specifikus gének: CD4, MSR1 és MPEG1 esetén, jelezve ezen sejtek beáramlását és/vagy helyi proliferációját a fertőzött tüdőszövetben. Érdekes módon, amikor az upregulálódott géneket összehasonlítottuk a Mouse Gene Atlas gén expressziós adatbázis adataival [310], a legjelentősebb átfedést az LPS-sel kezelt macrophág gén expresszióval találtunk, jelezve az aktivált macrophágok szerepét a chlamydia által indukált génexpressziós változásokban. Számos upregulálódott chemokint detektáltunk, beleértve a lymphocyta chemokineket, amelyek a sejtek beáramlását indukálhatják pl. a CCL2 (MCP-1), CCL5 (RANTES), CCL8 (MCP2), CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP10), CXCL11 (I-TAC), a monocyta chemokineket: CCL2, CCL4 (MIP1B), CCL7 (MCP3), CCL8 (MCP2), CXCL10 és neutrophil granulocyta chemokineket: CXCL5 (ENA78). A chemokinek hatásának fokozása érdekében különféle chemokin receptorok (CCR2, CCR4, CCR5, CXCR3) is upregulálódtak.

A GO molekuláris funkció elemzés alátámasztotta a KEGG út elemzést **(34B ábra).** Az a tény, hogy a különféle „sejtciklus” útvonalhoz kapcsolódó gének upregulálódtak, azt jelzi, hogy az aktivált sejtek beleértve a BALT-ot is, felgyorsult osztódást mutatnak. A sejt aktiválódását a ligand-receptor kölcsönhatások indukálják mind az adaptív, mind a veleszületett immunitásban. Az általunk azonosított legnagyobb funkcionális csoportok között szerepelt a „cytokin aktivitás”, a „transzmembrán jelátvitel” és a „protein kináz aktivitás”, amelyek

upregulálódott és erősen upregulálódott cytokineket, cytokin receptor géneket tartalmaztak. Számos az adaptív immunitással kapcsolatos gén, elsősorban az MHC-I antigén prezentációval kapcsolatos gének upregulálódtak. A kórokozó felismerésével/a proinflammatorikus állapottal kapcsolatos utak, pl. a TLR-ok (TLR1, TLR6, TLR7, TLR12), a citoszolban DNS-érzékelő, a NOD-szerű, a RIG-I-szerű utak is upregulálódott géneket tartalmaztak, ami azt mutatja, hogy a kórokozó extra- és intracelluláris formái is felismerhetők, és azok gyulladásos választ válthatnak ki. A cytokin jelátviteli útvonalak közül az IFN-nel kapcsolatos jelátviteli útvonalak és az IFN-indukálta génexpresszió különösen figyelemre méltó volt, beleértve az upregulálódó IFNG, STAT1, STAT2, IRF7, IRF9 géneket és az IFN által indukált géneket, mint például több hisztokompatibilitási komplex gént, valamint az IFN-indukálható GTPázokat, és a triptofán katabolizmusban szerepet játszó géneket, az IDO1-et és a KYNU-t.



34. ábra. *A C. muridarum fertőzés következtében megváltozott génkifejeződés funkcionális analízise Voronto módszerrel.* ***A****: A szignifikánsan megváltozott KEGG utak különbözően expresszálódott génjeinek analízise.* ***B****: A szignifikáns molekuláris funkciók különbözően kifejeződött génjeinek GO analízise. A különböző mértékben indukálódott IFN-indukálta GTPázok az aminosav sorrend szerint csoportosítva szeparáltan láthatók az upreguláció mértékével együtt. A Voronto szoftver az ún. Voronoi tesszelációt használja, hogy ábrázolja az ontológiai fogalmakat és útvonalakat. A térkép cellái ontológiai fogalmakat jelölnek, a közelebbi fogalmak közelebb helyezkednek el egymáshoz. A közös eredővel rendelkező fogalmakat vastagabb vonal határolja. A*

Voronto diagramm cella színei az adott Voronto-cellához kapcsolódó, különböző módon expresszált gének átlagos génkifejeződését (log2) mutatják. Mind a Voronto cellák, mind a gének esetében a log2-szeres változások a skála szerint színkódoltak. Az upregulálódott gének színe a világos kéktől a pirosig terjed, míg a downregulálódott gének a sötétkék színűek.

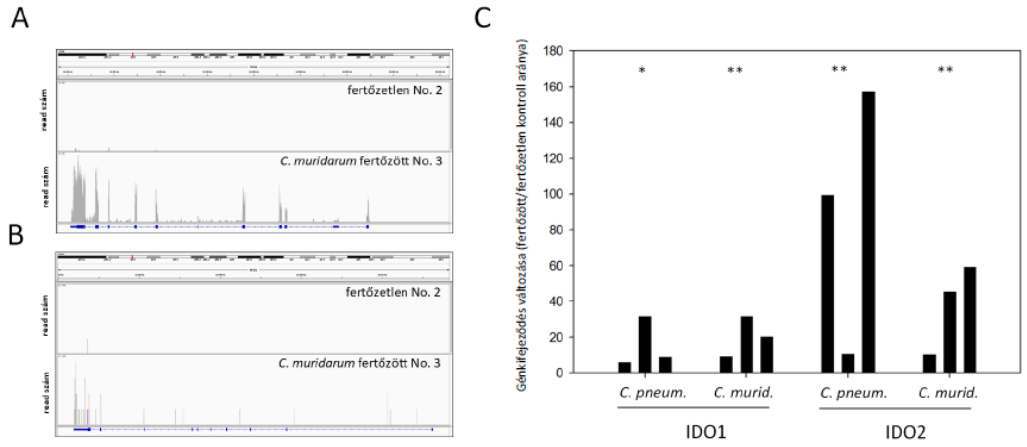
C. muridarum fertőzés által indukált antimikrobiális gének

Az általunk GO analízissel azonosított kategóriákon belül kiemelkedően fontos molekuláris funkcionális kategóriának bizonyult „a GTP-kötő" csoport. Az ebben a kategóriában található legtöbb GTPáz részt vesz az intracelluláris patogének elleni védekező mechanizmusokban **(34B ábra).** Alapvetően az egér IFN-indukálható GTPázok mind a négy osztályának kifejeződése upregulálódott volt, beleértve a különféle guanilát-kötő fehérjéket (GBP2-9, GBP11), a myxovirus rezisztencia-protein 1-et (MX1), az immunitással kapcsolatos GTPáz IRGM1-et (LRG47), IRGM2-őt (GTPI), IRGA6-ot (IIGP), IRGM3-at (IGTP), IRGB6-ot (TGTP1-2), IRGB10-et (Gm12250) és egy nagy IFN-indukálta GTPázt, a GVIN1-et. Figyelemre méltó, hogy három, az IIGP szekvenciával homológiát mutató gén (Gm4841, Gm4951, F830016B08Rik) és három, a TGTP szekvenciával homológiát (Gm12185, Gm5431, 9930111J21Rik1) mutató gén upregulálódottnak vagy erősen upregulálódottnak bizonyult a fertőzött egerek tüdejében **(34B ábra).** Érdekes módon a Gm12185, a Gm5431 és a 9930111J21Rik is a 11. kromoszómán helyezkedik el, annak a régiónak a közelében, ahol a *C. trachomatis* elleni potenciálisan védő gének találhatók [311] [312]. Az IFN-indukálható GTPáz gének mellett más gének, mint például a CXCL9, az iNOS és az IDO1, amelyek korábbról ismert anti-chlamydiás hatásúak mind az emberi, mind az egér chlamydia törzsekkel szemben, erősen upreguláltak voltak (127-szeres, 14-szeres és 24,7-szeres). További gének, amelyek ismert antimikrobiális aktivitással rendelkezhetnek, de eddig még nem írták le anti-chlamydiás aktivitásukat, fokozottan upreguláltak voltak: CXCL11 (345-szörös), IRG1 (252,7-szeres), lipocalin-2 (11-szeres), mucin-5 (8,7-szeres).

Az IDO1 és IDO2 RNS-Seq adatok validálása qPCR módszerrel

Váratlan felfedezés volt az a tény, hogy az IDO1 gén erősen upregulálódott volt (24.76-szoros) a fertőzött egerek tüdejében, mivel korábban más kutatók azt találták, hogy az IDO1 nem indukálható a *C. trachomatis* vagy a *C. muridarum* fertőzés során *in vitro* egér epithel és más sejtekben [53] [313]. Az IDO1 gén esetében szignifikánsan magasabb expressziót (P=0.037) detektáltunk a *C. muridarum*mal fertőzött mintákban a nem fertőzött mintákkal összehasonlítva, míg az IDO2 esetében az eltérés nem volt szignifikáns. Az IDO2 esetében a szekvenálással azonosított mRNS szakaszok (readek) száma nem volt elég ahhoz, hogy észlelhető legyen a szignifikáns eltérés **(35A,B ábra)**. Az IDO1 és IDO2 RNS-Seq adatok validálására qPCR-t használtunk. Emellett annak ellenőrzésére, hogy az IDO1-2 indukció csak az egér chlamydia törzs jellemzője-e, megmértük az IDO1-2 gének expresszióját a *C. pneumoniae* fertőzött egér tüdőmintákban is. A qPCR eredmények alátámasztották az RNA-Seq adatokat, a *C. muridarum* fertőzés az IDO1 20.38±11.3-szoros és az IDO2 38.2±25.2-szeres expresszióját eredményezte a nem fertőzött egerekkel összehasonlítva. A *C. pneumoniae*val

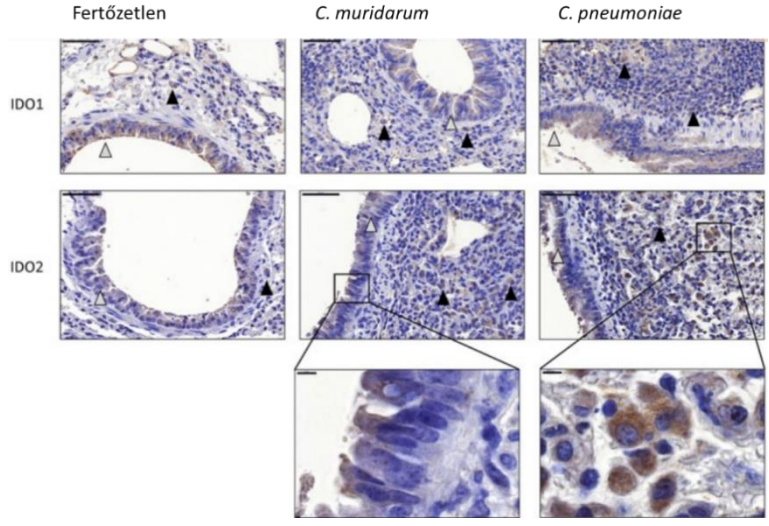
fertőzött tüdőszövetben a qPCR hasonló mértékű: az IDO1 15.5±14.1-szeres és 88.9±73.9-szeres expressziós növekedést mutatott az IDO2 esetében **(35C ábra).**



35. ábra. *IDO1 és IDO2 mRNS expressziós mérések RNA-Seq és qPCR módszerrel. Az Integrative Genomics Viewer képei* [314]*, IDO1* ***(A)*** *és IDO2* ***(B)*** *gének C. muridarum fertőzött és nem fertőzött kontroll mintákban.* ***(C)*** *Az indukált IDO1 és IDO2 gén expresszió qPCR-rel mérve C. muridarum és C. pneumoniae fertőzött tüdőszövetekben. Az IDO1 és IDO2 gén expresszió változásait az egyes fertőzött egerekben úgy számoltuk, hogy összehasonlítottuk a nem fertőzött kontrollokban mért átlagos IDO1 és IDO2 kifejeződéssel. Az IDO1 és IDO2 gén expressziókat a β-aktin gén expressziójára normalizáltuk, **P<0.01, *P<0.05.*

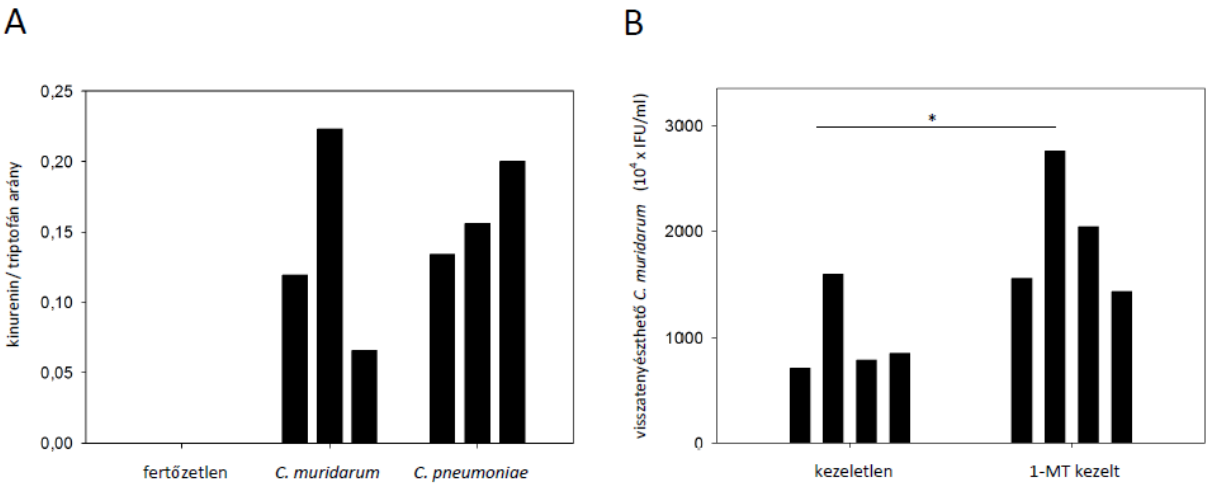
IDO1-2 fehérje expresszió és funkcionális aktivitás a C. muridarum és a C. pneumoniae fertőzött BALB/c egerek tüdőszöveteiben

Annak bizonyítására, hogy a megfigyelt IDO1 és IDO2 mRNS változások megmutatkoznak-e fehérje szinten, valamint azért, hogy meghatározzuk, hogy ezeket a fehérjéket milyen sejtek expresszálják, a *C. muridarum* és a *C. pneumoniae* fertőzött, és a nem fertőzött kontroll egerek tüdőmetszetein immunhisztokémiai vizsgálatot végeztünk. Mérsékelt IDO1-2 pozitivitást lehetett kimutatni a hörgő és esetenként az alveoláris hámsejtek citoplazmájában, viszont közepes/erős pozitivitás volt látható a *C. pneumoniae* és *C. muridarum* fertőzött egerek tüdőszöveteiben a macrophágokban **(36. ábra)**. A kontroll, nem fertőzött tüdőszövetek kisszámú IDO1-2 pozitív hörgőhámsejtet és macrophágot tartalmaztak.



36. ábra. *Az IDO1-2 fehérje expresszió kimutatása immunhisztokémiai úton chlamydia fertőzött és nem fertőzött egér tüdőben. Az IDO pozitív hámsejteket szürke háromszögek, az IDO pozitív macrophágokat fekete háromszögek mutatják. Mérték: 50 µm. Az epitheliális sejtek és macrophágok jellegzetes IDO festése felnagyított négyzetben látható. Mérték: 5 µm.*

Annak meghatározására, hogy az expresszált IDO1 és IDO2 fehérjék funkcióképesek-e, nagy teljesítményű folyadékkromatográfia (HPLC) analízist végeztünk az egerek tüdőmintáiból. Az IDO1-2 funkcionális aktivitást úgy mértük, hogy meghatároztuk a teljes triptofán szintet és a triptofán lebomlási metabolitjának, a kinureninnek a szintjét a BALB/c egerek tüdőfelülúszóiban. A HPLC módszerrel nem tudtunk kimutatni kinurenint a nem fertőzött tüdőkben, míg a *C. muridarum* és a *C. pneumoniae* fertőzött tüdőkben 369.6±199.8 nM és 508.7±176.6 nM mennyiség volt mérhető. Mivel a fertőzött és a kontroll szövetekben nem tudtuk megállapítani a sejtek számát, a mintákban mért értékeket a korábban leírt kinurenin/triptofán arány alkalmazásával normalizáltuk [315]. A kinurenin/triptofán arány 0.12 és 0.22 között volt a *C. muridarum* fertőzött mintákban, 0.13–0.20 a *C. pneumoniae* fertőzött mintákban, míg ez az érték 0 volt a kontroll mintákban **(37A ábra)**. Az IDO-aktivitás *C. muridarum* szaporodására gyakorolt hatásának tisztázására 1-MT kezeléssel gátoltuk az IDO1-2 aktivitást az egerekben *in vivo*, a fertőzést megelőző hét naptól, a fertőzést követő hetedik napig **(37B ábra)**. Az 1-MT kezelés a fertőzést követő 7. napon mérsékelt, de szignifikáns, 1.98-szoros növekedést eredményezett a visszatenyészthető *C. muridarum* IFU számában.

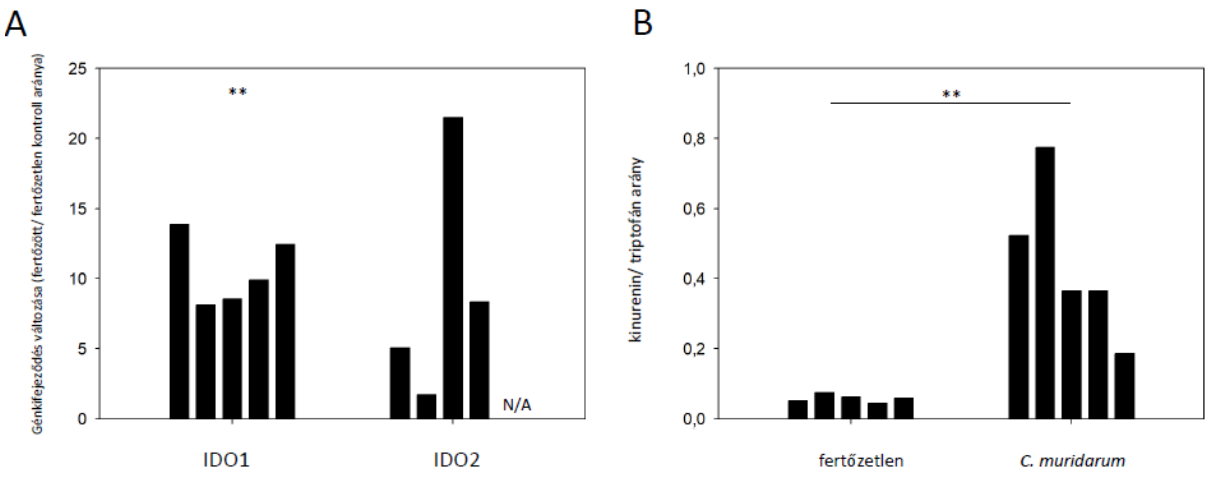


37. ábra. *A triptofán lebomlásának mérése a chlamydia fertőzött egér tüdőszövetekben és az IDO1-2 gátlás hatása a C. muridarum szaporodására.* ***(A)*** *A C. muridarum, a C. pneumoniae fertőzött és a nem fertőzött tüdőszövetek kinurenin és triptofán koncentrációjának mérésére. Az ábrán a vizsgált tüdők kinurenin/triptofán aránya látható. A nem fertőzött minták kinurenin koncentrációja a kimutatási határ alatt volt.* ***(B)*** *Kezeletlen és 1-MT-vel kezelt BALB/c egereket fertőztünk C. muridarummal, és a visszatenyészthető IFU-kat a fertőzést követő 7. napon mértük. Az ábra az egyes vizsgált tüdőkből visszatenyészthető IFU-t mutatja, * P<0.05.*

IDO1-2 mRNS expresszió és aktivitás a C. muridarum fertőzött C57BL/6 egér tüdőszövetekben

Annak feltárására, hogy a chlamydia indukált IDO1-2 aktivitás nem kizárólag BALB/c egerekben figyelhető meg, hanem másik egér törzsben is, qPCR és HPLC analízist végeztünk *C. muridarum* fertőzött és nem fertőzött C57BL/6 egerek tüdő mintáival. A qPCR adatok az IDO1 mRNS szint szignifikáns növekedését mutatták a *C. muridarum* fertőzött tüdőben (az upreguláció tartománya: 8.14–13.88). Bár az IDO2 mRNS kifejeződése nem fokozódott

szignifikánsan, upregulációs tendencia megfigyelhető volt (upreguláció tartománya: 1.71–21.49) **(38A ábra).** A nem fertőzött C57BL/6 egér tüdők kis mennyiségű kinurenint tartalmaztak a HPLC analízis alapján (kinurenin/triptofán arány: 0.045–0.075) viszont a *C. muridarum* fertőzés szignifikánsan növelte az IDO aktivitást (0.185-0.773 kinurenin/triptofán arány) **(38B ábra)** az egerek tüdejében.



38. ábra. *Az IDO1 és IDO2 gén expressziójának qPCR mérése C. muridarum fertőzött C57BL/6 tüdőszövetekben.* ***(A)*** *Az egyes fertőzött egerekben az IDO1 és IDO2 gén expressziós változások. **P<0.01. N/A: az IDO2 mRNS expressziója nem volt kimutatható.* ***(B)*** *A triptofán lebomlásának mérése a C. muridarum fertőzött C57BL/6 tüdőszövetekben. A C. muridarum fertőzött és nem fertőzött tüdőszövetek kinurenin/triptofán koncentráció aránya látható, **P<0.01.*

A *C. muridarum*mal fertőzött egér tüdők RNS szekvencia elemzése azt mutatta, hogy széles körben változott a gazdagének expressziója, és több upregulált 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 cytokin/chemokin expresszióval, a chemotaxissal, a szignál-transzdukcióval, az antigén bemutatásával, a sejtosztódással és a veleszületett antimikrobiális védekezéssel kapcsolatosak. A chlamydia patogenezis celluláris elmélete szerint a nem immunsejtek is kiválthatják a gyulladást proinflammatorikus cytokinek és chemokinek szekretálásával [30]. A cytokinek/chemokinek celluláris forrását nem lehet azonosítani a szöveti szintű génexpressziós elemzéssel, de az *in toto* chemotaxis indukciójával és a celluláris beáramlással kapcsolatos génexpresszió hatása felismerhető volt a *C. muridarum* fertőzött egerek tüdejében. A szekretált cytokinek autokrin-parakrin hatásai, valamint a rezidens és az újonnan érkező sejtek közötti kölcsönhatás olyan miliőt eredményezhet, amely komplex gén expressziót indukál, magában foglalva bizonyos anti-chlamydiás gének indukálását.

Az IFN-indukálta GTPáz család számos tagját erősen indukáltnak találtuk. Bár nem mértük a *C. pneumoniae* által kiváltott génexpressziós változásokat (csak a *C. muridarum* esetén), a korábbi vizsgálatok azt mutatták, hogy mind az egér, mind az emberi chlamydia törzsek

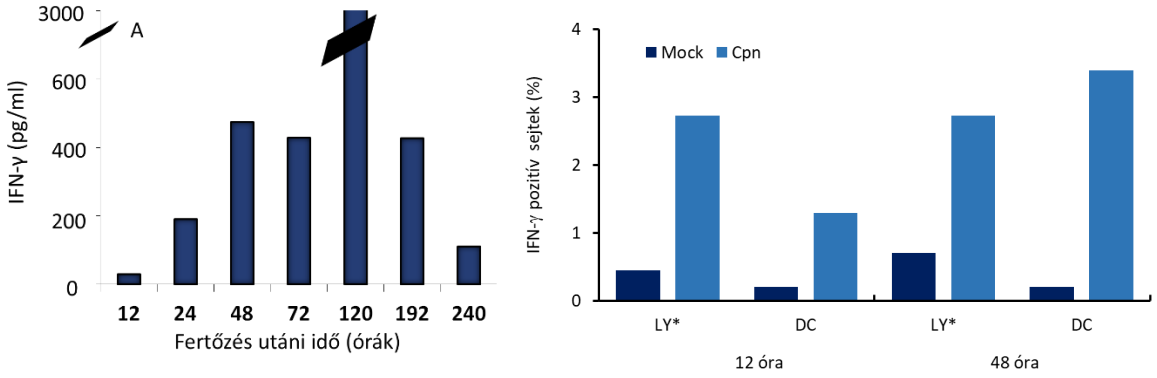
képesek voltak beindítani az IFN-indukálta GTPázok termelését [53][316]. Az IRGM1 (LRG47), IRGM3 (IGTP), IRGA6 (IIGP) és IRGB10 GTPázok upreguláltak vagy erősen upreguláltak voltak, és korábban bizonyították, hogy részt vesznek a humán *C. trachomatis* törzs eliminálásában [53][312][64], de valószínűleg nem hatékonyak az egér chlamydia ellen [53][64]. Úgy találtuk, hogy bizonyos GTPáz gének a *C. muridarum* fertőzést követően erősen upregulálódnak és részt vehetnek a chlamydia ellenes védekezésben. Ezen gének közül három (Gm12185, Gm5431, 9930111J21Rik1) szekvencia hasonlóságot mutat az IRGB10-zel, egy ismert, *C. trachomatis* elleni védelemben szerepet játszó egér génnel [312]. Coers és munkatársai viszont kimutatták, hogy a *C. muridarum* képes megkerülni az IRGB10 anti-chlamydiás hatását [64]. Az IFN-indukálta GTPázokkal szembeni különböző érzékenység magyarázhatja azt a tényt, hogy annak ellenére, hogy 400-szor több *C. pneumoniae* IFU-t használtunk a fertőzésre, mint *C. muridarum*ból, összehasonlítható IFU-kat (visszatenyészthető chlamydiát) nyertünk a fertőzött egér tüdőkből. Egy másik, anti-chlamydiás hatással rendelkező gén, az iNOS is erősen upregulálódott volt (14-szeres). Az iNOS indukciója az egerekben fontos mechanizmusnak bizonyult a *C. muridarum* fertőzés kései szakaszában a nemi szervből történő eliminálásban [317], továbbá a RAW 264.7 egér macrophágokban is [318]. A *C. muridarum* fertőzés során az IRG1-et, egy IFN-indukálta gént is [319] erősen upregulálódottnak (252,7-szeres) találtuk. Kimutatták, hogy az IRG1 expresszálódik macrophágokban [320], megtalálható a *Legionella pneumophila* vakuolákban macrophágokban, és antimikrobiális aktivitással rendelkezik a reaktív oxigén gyökök termelésének fokozása [321] és a közvetlen baktericid hatású itakonsav termelése révén [320]. A CXC chemokin MIG szintén erősen upregulált volt (127-szeres) a *C. muridarum* fertőzést követően. Korábban kimutattuk, hogy a MIG-nek koncentráció-függő direkt toxicitása van a *C. muridarum*, a *C. trachomatis* [316] és a *C. pneumoniae* EB-kre is [322]. 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 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. A kimutatott IDO1-2 pozitív macrophágok nagyobb száma lehet az *in situ* IDO1-2 indukció és/vagy a már IDO1-2 pozitív monocyták gyulladt szövetbe való beáramlásának következménye. Az is lehetséges, hogy az IDO1-2 pozitív macrophágok helyileg aktiválódtak, ami magasabb IDO1-2 aktivitást eredményezett. A korábbi *in vivo* vizsgálatok szövetszintű IDO indukciót mutattak ki különböző egér szövetekben, amelyeket *E. coli* [323], *Plasmodium berghei* [324] és *Toxoplasma gondii* [325] kórokozókkal fertőztek. Érdekes módon a *C. pneumoniae* indukálta tüdő IDO1 expressziót $RAG^{-/-}$ egerekben is kimutatták, de a vad típusú C57BL/6 kontrollokban nem [326]. *In vivo* sejtszintű IDO indukciót egér bélhámsejtekben detektáltak *Eimeria falciformis* fertőzés után [327], tüdőhámsejtekben influenza A vírusfertőzés után [328] és tüdőhámsejtekben,

endothel sejtekben, macrophágokban, dendritikus sejtekben *M. tuberculosis* fertőzés után [329]. A génkiütött egér modelleken végzett tanulmányok alapján - hasonlóan az emberhez - az IDO expressziójának egyik fő induktora *in vivo* az IFN-γ és az IFN-α/β [323][328]. Génexpressziós adataink szerint a *C. muridarum* fertőzés által aktivált egyik legfontosabb hálózat az IFN jelátviteli út, ennek megfelelően az IDO1-2 gén indukció egyértelműen jelen volt a chlamydia fertőzött szövetekben. A HPLC vizsgálat a BALB/c egér tüdőben a kinurenint, a triptofán bomlástermékét nem tudta detektálni a fertőzetlen egér tüdőszövetekben, bár a nem fertőzött hámsejtekben és macrophágokban mutatkozott alacsony szintű IDO1-2 fehérje pozitivitás, ez nem eredményezett jelentős triptofánt katabolizmust, viszont az IDO1-2 enzimek indukálódtak és funkcionálisan aktívak voltak mind az egér, mind az emberi chlamydiával fertőzött tüdőszövetekben. Kvantitatív immunhisztokémiai vizsgálatot nem végeztünk, de hasonló szintű IDO1-2 pozitivitást figyeltünk meg az epitheliális sejtekben infekció előtt és után, ami arra utal, hogy az IDO1-2 nem indukálódik, és az IDO1-2 aktivitás valószínűleg nem vesz részt a chlamydia eliminálásában az egér tüdő hámsejtekben. További mennyiségi vizsgálatokra lenne szükség az egér epitheliális IDO expressziónak és pontos szerepének tisztázására. Az a tény, hogy a C57BL/6 egerek tüdeje is IDO aktivitást mutatott chlamydia fertőzés hatására, alátámasztja azt, hogy a megfigyelt IDO indukció nem egér törzs-specifikus válasz. Az egér IDO szerepe a chlamydia *in vivo* eliminálásában nincs pontosan leírva. Az IDO1 génkiütött egerek a vad típusokhoz hasonló módon, de nem azonos kinetikával eliminálták a *C. muridarum*ot az urogenitális traktusból [53], de meg kell jegyezni, hogy ezekben az állatokban az IDO2 gén jelen volt [330]. Az IDO1-2 aktivitás antimikrobiális szerepének tisztázása céljából a BALB/c egereket 1-MT-vel (amely az IDO1 [331] és az IDO2 [332] korábban leírt inhibitora) kezeltük. Az IDO gátlása azt mutatta, hogy mérsékelt, de szignifikáns, megközelítőleg kétszeres mennyiségű chlamydia IFU tenyészett vissza az 1-MT-vel kezelt egerekben, jelezve, hogy az IDO aktivitás befolyásolja a *C. muridarum* replikációját *in vivo*. Mind a *C. muridarum,* mind a *C. pneumoniae* fertőzés egyértelműen IDO1-2 pozitív macrophágok jelenlétéhez vezetett, és ez a leukocyta beáramlás/aktiváció fontos tényező lehetett a megnövekedett IDO1-2 aktivitásban. A monocyták szerepet játszanak a *C. pneumoniae* terjedésében a fertőzések elsődleges helyéről [333], de az emberi monocyták képesek voltak meggátolni a *C. trachomatis* szaporodását IDO-függő [334] és -független mechanizmusokkal is [335]. További vizsgálatot igényel annak kiderítése, hogy az egér macrophágok IDO aktivitása hozzájárul-e a *C. muridarum* és a *C. trachomatis* szaporodásának kontrollálásához.

A C. pneumoniae fertőzött dendritikus sejtek (DC-k) és az IFN-γ kapcsolata

Korábbi tanulmányokban beszámoltak arról, hogy az IFN-γ tápfolyadékhoz adása korlátozza a fertőzőképes chlamydia utódok kialakulását macrophágokban, ami azt sugallja, hogy az IFN-γ részt vesz a *C. pneumoniae* perzisztencia kialakításában ezekben a sejtekben [336]. Munkánk során arra a kérdésre kerestük a választ, hogy bizonyos celluláris faktorok, beleértve az IFN-γ-t is, melyek a fertőzés során termelődnek, vajon meg tudják-e gátolni a *C. pneumoniae*

szaporodását az egészséges véradók perifériás monocytáiból általunk érlelt DC-kben. Munkánk során először azt vizsgáltuk, hogy a *C. pneumoniae* fertőzött DC-k termelnek-e IFN-γ-t. A *C. pneumoniae* fertőzést és mock kezelést követően a sejtek felülúszóját különböző időközönként begyűjtöttük. Az eredmények szerint a fertőzött DC kultúrákban az IFN-γ az 1.-től a 10. napig volt kimutatható, a maximális koncentrációt az 5. napon mértük (3000 pg/ml), a koncentráció ezek után csökkent **(39A ábra)**. A kontaminációként jelen levő lymphocytákat a DC-k által prezentált chlamydiális antigének valószínűleg stimulálhatták, így az is kérdéses volt, hogy a DC-k, illetve a kontamináns lymphocyták milyen mértékben felelősek az IFN-γ termelődésért. Ennek kiderítésére megvizsgáltuk a DC kultúra celluláris komponenseinek IFN-γ expresszióját különböző időpontokban a fertőzést követően. Az **39B ábrán** látható, hogy a fertőzést követő 12 és 48 órában a lymphocyták nagyobb százaléka expresszált IFN-γ-t mint a DC-ké. Azonban az IFN-γ jelen volt olyan sejtekben is, melyek negatívak voltak T- és B-lymphocyta, NK sejt, monocyta, valamint macrophág markerekre, viszont kifejeződött rajtuk a humán monocyta eredetű DC-kre jellemző HLA-DR és CD11c felszíni antigén [337][338], világosan mutatva, hogy a DC-k egy alcsoportja a *C. pneumoniae* fertőzésre IFN-γ termeléssel válaszol.



39. ábra: *A DC-k IFN-γ termelése.* ***A:*** *C. pneumoniae fertőzést követően a DC felülúszóból különböző időpontokban meghatároztuk az IFN-γ tartalmat ELISA módszerrel. A megosztás az oszlopon a >3000 pg termelődött IFN-γ-t mutatja.* ***B:*** *a DC-k és a kontaminációként jelenlevő lymphocyták IFN-γ termelését sejt szinten ellenőriztük. A fertőzött és mock fertőzött sejteket különböző időpontokban begyűjtöttük és megfelelő monoklonális ellenanyagokkal festettük. A DC sejtek azonosítása áramlási citometriás vizsgálattal történt (CD11c, HLA-DR és IFN-γ pozitivitás). A lymphocyták kimutatására lineage cocktailt és anti-humán IFN-γ monoklonális ellenanyagot használtunk.*

Az IFN-γ neutralizálás hatása a DC-k fertőző EB termelésére

A DC-k a periférián telítődnek az antigénnel és vándorlásuk során érési folyamaton esnek át, de gazdául is szolgálhatnak pl. látens/perzisztens pathogének számára. A monocyták, a monocyta-eredetű DC-ék és a macrophágok kölcsönhatása a *C. pneumoniae*val kevéssé dokumentált. A különböző faktorok – köztük az IFN-γ, melyet a fertőzött DC-k termelhetnek – lehetséges gátló hatását vizsgáltuk olyan módon, hogy a fertőzött általunk *in vitro* érlelt DC-k neutralizáló hatású anti-IFN-γ ellenanyaggal kezelt, vagy nem kezelt felülúszóját transzferáltuk *C. pneumoniae*val fertőzött HEp-2 sejtkultúrára. A *C. pneumoniae*val fertőzött, de nem kezelt

DC felülúszó csökkentette a *C. pneumoniae* hozamot a HEp-2 sejteken, a gátlás 168-szoros volt a kontrollhoz képest. A gátlás viszont csak 39-szeres volt akkor, ha a fertőzött HEp-2 sejtekre a *C. pneumoniae* fertőzött és anti-IFN-γ ellenanyaggal kezelt felülúszó került. Azon hipotézis igazolására, hogy a fertőzött DC-k által termelt IFN-γ gátolja-e a fertőző EB-k termelődését (magában a DC-kben), a fertőzött DC-ket neutralizáló anti-IFN-γ-val kezeltünk 5 napon keresztül, és teszteltük a fertőzőképes EB-k mennyiségét HEp-2 sejteken történő visszatenyésztéssel. Az IFN-γ neutralizációja megfelelő volt, mivel az IFN-γ koncentrációja lecsökkent <9.4 pg/ml-re az anti-IFN-γ kezelt DC kultúrákban, összehasonlítva azt a nem kezelt kultúrák >3000 pg/ml IFN-γ koncentrációjával. Ennek ellenére az anti-IFN-γ-kezelt vagy nem kezelt DC-kben termelődött fertőzőképes EB-k mennyiségében nem volt különbség. Ezek az eredmények rámutatnak arra, hogy elsősorban nem az IFN-γ felelős a *C. pneumoniae* szaporodásának gátlásáért a DC-kben. Irodalmi adatok alapján a *C. pneumoniae* fertőzött DC-k TNF-α-t termelnek [339]. Annak eldöntésére, hogy a TNF-α lenne felelős a DC-kben a *C. pneumoniae* szaporodásának gátlásáért, az IFN-γ neutralizációs kísérlethez hasonlót végeztünk. Az eredmény hasonló volt, vagyis az anti-TNF-α sem önmagában, sem pedig anti-IFN-γ-val kombinációban használva nem változtatta meg a DC-k EB produkcióját.

A DC sejtek mint egyfajta kapocs szolgálnak a természetes és az adaptív immunválasz között, szerepük a fertőzések, különösen az intracelluláris pathogének ellen kiemelkedő. A chlamydiák szaporodását különböző epitheliális sejtekben az IFN-γ gátolja [340][341][342]. Ráadásul a monocyta eredetű macrophágok kezelése IFN-γ-val nem replikálódó, morphológiailag aberráns inklúziós testek termelődését eredményezte, melyek különböző *C. pneumoniae* géneket fejeztek ki, és ezek *C. pneumoniae* perzisztenciát közvetítettek a sejtekben [336]. A kutatók úgy gondolják, hogy néhány szolúbilis molekula, beleértve az általunk vizsgált IFN-γ-t és TNF-α-t, mely jelen lehet a humán DC kultúrák felülúszóiban, hozzájárulhat az ezen sejtekben megbújó baktériumok teljes körű replikációjának a gátlásához [339]. Kísérleteink során azt az eredményt kaptuk, hogy öt napos *C. pneumoniae* fertőzésen átesett DC-k felülúszóit transzferálva *C. pneumoniae* fertőzött HEp-2 sejtekre, csökkentette a *C. pneumoniae* replikációt, ami arra utalt, hogy az IFN-γ és/vagy a TNF-α, vagy más celluláris termékek gátló koncentrációban voltak a DC-k felülúszójában. Abban az estben, ha a *C. pneumoniae* fertőzött DC kultúrákat próbáltuk neutralizálni anti-IFN-γ és anti-TNF-α ellenanyagokkal és ezt követően visszatenyészteni a DC sejtek *C. pneumoniae* tartalmát HEp-2 sejtkultúrán, azonban nem jártak sikerrel (ugyan annyi chlamydiát tenyésztettünk vissza mint a kezeletlen sejtből) ami arra utal, hogy a DC kultúrákban a *C. pneumoniae* perzisztens állapot kialakításában az IFN-γ-tól és a TNF-α-tól független mechanizmusok játszhatnak szerepet. Annak ellenére, hogy *in vitro* rendszerünkben a kontaminánsként jelenlevő lymphocyták termelték a DC kultúrákban mért IFN-γ egy részét, a DC sejtek IFN-γ szintetizáló képességének is jelentősége lehet az intracelluláris pathogének ellen kialakuló immunválasz korai szakaszában. A DC által termelt IFN-γ-nak, pl. autokrin amplifikáló szerepe lehet vagy a TLR közvetített válasz kostimulátora lehet a DC-kben, ahogy ezt leírták a humán DC-k *Mycobacterium* indukálta IFN-γ termelésével kapcsolatban [343].

Összefoglalás

Munkánk eredményeként az alábbi új megállapításokat tettük ebben a témában

1. Kimutattuk, hogy az exogén IFN-γ emelte a természetes és az adaptív immunitással kapcsolatos gének expresszióját chlamydia fertőzött egér epithel sejtekben, ami pozitív visszacsatolásként megnövekedett neutrophil granulocyta és lymphocyta infiltrációt és aktivációt eredményezhet.
2. Kimutattuk, hogy exogén IFN-γ serkentette a direkt anti-chlamydiás hatással rendelkező gének expresszióját.
3. Bizonyítottuk, hogy a MIG/CXCL9 anti-chlamydiás hatással rendelkezik, és a hatása függ a koncentrációtól, az időtől és az alkalmazott chlamydia törzstől.
4. Kimutattuk, hogy a *C. pneumoniae* fertőzés indukálta az egerek tüdejében a MIG/CXCL9, az IP-10/CXCL10 és az I-TAC/CXCL11 expresszióját.
5. Detektáltuk, hogy az élő *C. pneumoniae* és inaktivált formája *in vitro* indukálta a MIG/CXCL9 termelődését J774A macrophág, valamint egér fibroblaszt sejtekben. A chlamydiával együtt alkalmazott IFN-γ kezelés jelentősen növelte a MIG/CXCL9 termelést, különösen a nem immuneredetű fibroblasztok által.
6. Bizonyítottuk továbbá, hogy a *C. pneumoniae* 60 kDa molekulasúlyú proteinje felelős a MIG/CXCL9 kötődésért.
7. Bizonyítottuk, hogy a *C. muridarum* - ellentétben a más kutatók által *in vitro* találtakkal - fokozza az antimikrobiális hatással bíró IDO kifejeződését az egerek tüdejében.
8. Igazoltuk, hogy az IDO fehérje szinten is kifejeződik mind a *C. muridarum,* mind pedig a *C. pneumoniae* fertőzött egerek tüdejében és a kinurenin/triptofán arány mérésével bizonyítottuk funkcionális aktivitását.
9. Bizonyítottuk, hogy a chlamydia fertőzés különböző egértörzsekben is képes az IDO aktivitás fokozására.
10. Az IDO *in vivo* neutralizálásával bizonyítottuk, hogy az enzimnek szerepe van a fertőzés során a chlamydia szaporodás gátlásában.
11. Kimutattuk, hogy a *C. pneumoniae* fertőzött DC szubpopuláció IFN-γ termelésre képes, ami hozzájárulhat *C. pneumoniae* elleni immunválasz formálásához és a *C. pneumoniae*hoz társított krónikus betegségek immunpathológiájához, viszont nem befolyásolja a kórokozó szaporodását a DC-kben.

4.4. A chlamydiák okozta fertőzések megelőzésének lehetőségei

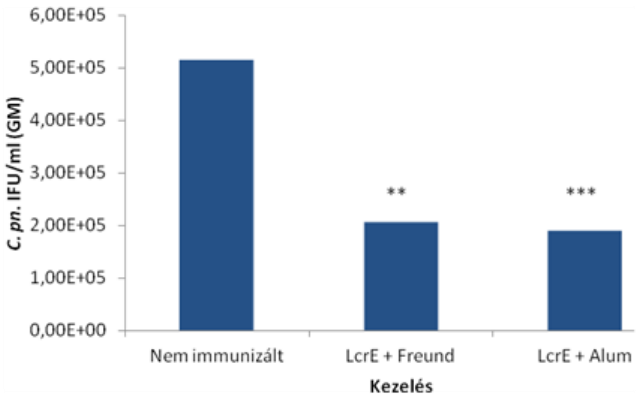
Ebben a témában az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

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 protein 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 proteinekkel történt immunizálás indukálja-e a specifikus ellenanyagok termelődését az egerekben?
8. Képes-e csökkenteni a patológiás kép súlyosságát és a gyulladásos cytokinek mennyiségét a pGP3 és a pGP4 vakcina?
9. Protektív-e a pGP3 és a pGP4 vakcina, azaz képes-e csökkenteni a visszatenyészthető *C. muridarum* mennyiségét?
10. A vakcinálás hatására létrejött protekcióért az egerekben a kialakult celluláris vagy humorális immunválasz-e a felelős?

A Freund illetve Alum adjuváns kíséretében alkalmazott LcrE protein indukálta immunválasz és protektív hatása egerekben C. pneumoniae fertőzés során

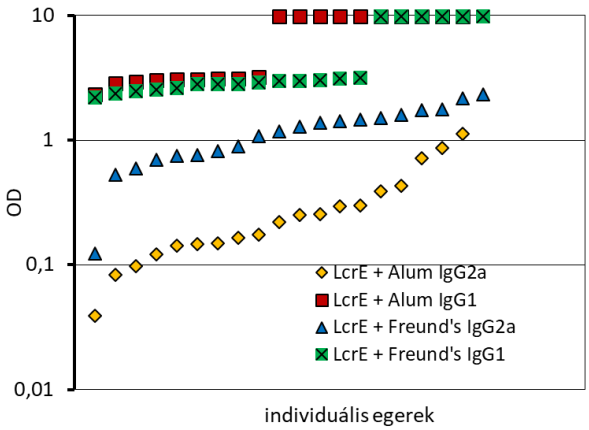
Chlamydia betegségek elleni immunizációs kísérleteink előtt szerettük volna tisztázni azt, hogy a más kutatók által, a chlamydia vakcinák adjuvánsaként használt Freund adjuváns (mely állatkísérletekben elfogadott) által kiváltott immunválasszal összevethető-e a humán gyógyászatban elfogadott Alum adjuváló hatása. Ennek vizsgálatára az általunk rekombináns technológiával előállított *C. peumoniae* TTSS komponens LcrE fehérjével Alum, vagy Freund adjuvánssal keverve immunizáltunk BALB/c egereket. Az immunizálást követően magas titerű LcrE specifikus IgG-t detektáltunk ELISA módszerrel az egerek szérumában, nem volt szignifikáns különbség a kétféle adjuváns által indukált ellenanyag szintek között (GM: LcrE+Freund: 172 216; és az LcrE+Alum esetében 164 540). Az ELISA rendszerben kapott eredményt megerősítettük Western blot vizsgálattal is. Annak vizsgálatára, hogy az LcrE protein Freund, illetve Alum adjuvánssal bejuttatva képes-e protektív immunválaszt indukálni az egerekben *C. pneumoniae* fertőzéssel szemben, összehasonlítottuk a *C. pneumoniae* titereket immunizált és nem immunizált csak fertőzésen átesett egerek tüdő felülúszóiban. A visszatenyészthető *C. pneumoniae* titerének csökkenése a nem immunizált kontrollokkal

összehasonlítva 60% volt a Freund adjuváns használata esetén, és 63%, ha Alum adjuvánst alkalmaztunk **(40. ábra)**. A protekció szignifikáns volt az LcrE fehérje+Freund adjuvánssal végzett immunizálás esetén: *P*<0.0007, és az LcrE+Alum immunizálás esetén is: *P*<0.0003, tehát nem mutatkozott különbség a használt adjuvánsokkal elért protektivitás tekintetében.



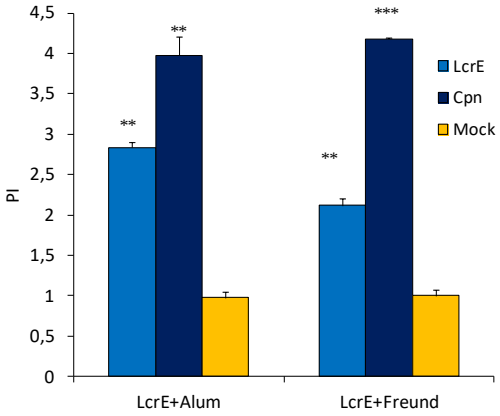
40. ábra. *Az LcrE immunizált egerek tüdejében mérhető C. pneumoniae titer a C. pneumoniae fertőzést követően. Az oszlopok 20-20 egér tüdő C. pneumoniae titerének a geometriai átlagát jelölik. (**P<0.0007; ***P<0.0003).*

Az LcrE immunizált egerekben az alkalmazott adjuvánstól függetlenül a szérumban magas IgG1 szintet mértünk, azonban a Freund immunizált egerek csoportjában az IgG2a szint magasabbnak bizonyult **(41. ábra)**. Mindkét adjuváns kevert Th1/Th2 ellenanyag izotípus mintázatot indukált: a magasabb IgG2a szint a Th1-es típusú válaszra utal a Freund adjuvánssal immunizált egerekben.



41. ábra. *LcrE specifikus IgG1 és IgG2a szintek az LcrE immunizált majd C. pneumoniae fertőzött egerek szérumában. Az LcrE specifikus IgG szubtípusokat az immunizált egerek szérumában ELISA teszttel mértük. A szimbólumok egyedi egerek szérumának OD értékét mutatják.*

Az immunizálás hatékonyságára utaló LcrE specifikus T-sejt reaktivitás vizsgálatára lymphocyta proliferációs tesztet végeztünk. Az egerek lépsejtjeit *in vitro* restimuláltuk LcrE fehérjével vagy *C. pneumoniae*val vagy mock antigénnel. Meghatároztuk a proliferációs indexeket. Az LcrE fehérjére és a *C. pneumoniae* antigénre is ki tudtunk mutatni proliferációs választ mind a két módon immunizált állatok lépsejtjeit vizsgálva **(42. ábra)**.



42. ábra. *LcrE immunizált egerek lépsejtjeinek proliferációs képessége. Immunizált egerek lépsejtjeit összekevertük, majd in vitro LcrE proteinnel vagy C. pneumoniae antigénnel vagy mock antigénnel kezeltük és a proliferáció mértékét MTT tesztben határoztuk meg. Az oszlopok proliferációs indexek átlagát mutatják. A proliferációs indexek szignifikánsan magasabbak voltak LcrE protein vagy C. pneumoniae antigén, mint a mock stimulálás hatására [P<0.005** Alum adjuváns; P<0.005** (LcrE protein), P<0.0005*** (C. pneumoniae antigén) Freund adjuváns esetén].*

Az LcrE immunizálás által aktivált T-sejtek közül a Th1-es csoportba tartozó sejtek számának megbecsülésére meghatároztuk az IFN-γ termelő sejtek számát ELISpot módszerrel. Az LcrE proteint akár Freund, akár Alum adjuvánssal kombináltuk, az *in vitro* restimulációs tesztben hasonló számú IFN-γ termelő sejt indukálódott. Egymillió perifériás sejtre nézve az IFN-γ termelő sejtek száma a Freund immunizált csoportban az LcrE stimulációra 850, a *C. pneumoniae* antigén stimulációt követően 630 volt, az Alum immunizált csoportban hasonló stimulusok hatására 820, illetve 530 SFC volt**.**

Az elmúlt évtizedekben nagy figyelem fordult a *C. pneumoniae*ra, nemcsak mint légúti pathogénre, hanem olyan mikroorganizmusra, amelyet kapcsolatba hoztak krónikus megbetegedésekkel [344][345][346]. Mivel a *C. pneumoniae* fertőzés sokszor nem kerül diagnózisra, így 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, amely kontrollálni tudná a meglehetősen gyakori, a kórokozó által okozott megbetegedéseket. A chlamydia genomika és proteomika legújabb előrelépéseinek köszönhetően, alegység vakcinák kifejlesztése került előtérbe. A több alegységet tartalmazó chlamydia vakcina valószínűleg hatékony, hosszú távú immunitást alakíthatna ki. Az egyik potenciális alegység vakcina jelölt az LcrE (CopN) protein, amely egy szekretált effektora és negatív regulátora a *C. pneumoniae* TTSS rendszerének [347]. Jelen kísérleteink eredményei alapján alátámaszthatjuk azokat a korábbi tanulmányokat, melyben leírták az LcrE-t mint jelentős, potenciális vakcina alegységet [348][349]. Az alegység vakcinák természetüknél fogva viszonylag kevéssé immunogének, ezért hatékony adjuváns rendszer szükséges használatuk során. Tammiruusu és munkatársai LcrE immunizáció kapcsán a protein hő-aggregált formáját kombinálták *E. coli* hőlabilis toxinjával egér modellben [348]. Sambri és csoportja az LcrE proteint komplett Freund adjuváns kíséretében használta hörcsögök immunizálására [349]. Jelen munkánkban az általunk előállított rekombináns LcrE protein által indukált immunitás protektív képességét és típusát vizsgáltuk. Az LcrE fehérjét Alummal formuláltuk és hatását összehasonlítottuk a Freund adjuvánséval bejuttatott LcrE immunogenitásával, protektivitásával. Választásunk a Freund adjuvánsra mint egyfajta pozitív kontrollra azért esett, mert az állatkísérletekben ez az adjuváns a „gold standard”, kitűnik

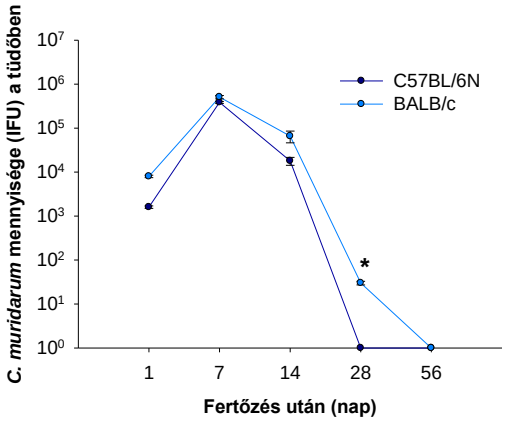
ellenanyag és T-sejt választ, különösen Th1-es választ indukáló hatásával [350][351]. A celluláris immunválasz alapvető a gazdaszervezet védelmében intracelluláris pathogének, mint pl. a *C. pneumoniae*val szemben. A sejt mediálta immunválasz mechanizmusai a chlamydiák okozta betegségekben még nem tisztázottak. A humán *C. pneumoniae* fertőzések során mind a $CD4^+$, mind a $CD8^+$ sejtek aktiválódnak [352]. Chlamydia fertőzések során az ellenanyagok szerepe a védelemben meglehetősen ellentmondásos. Mindkét immunizálási protokollunk szerint szignifikánsan csökkent a visszatenyészthető *C. pneumoniae* száma a fertőzést követően az egerek tüdő felülúszójában a kontroll egerekkel összehasonlítva. Mivel az adjuvánsoktól az elvárható, hogy polarizálják a Th1/Th2 egyensúlyt különböző irányba, ezért kísérletünk során az antigénünket különböző adjuvánsokkal formuláltuk, és elemeztük a hatásukra kialakuló immunválaszt, különös tekintettel a celluláris immunválaszra.

Az LcrE proteinünk mindkét adjuvánssal beadva magas, specifikus IgG szintet idézett elő az egerekben. Az ellenanyagok felismerték a tisztított *C. pneumoniae* EB-k lizátumában az LcrE proteint Western blot tesztben is. Korábbi eredményekkel egybevágóan ez azt igazolja, hogy az LcrE fehérje az EB-kben megtalálható [78]. Az LcrE protein elérhető az immunrendszer számára a *C. pneumoniae* fertőzés alatt, ahogy ezt a több alkalommal oltott egerek szérumai **(40. ábra)**, valamint a mikroimmunfluoreszcens tesztben, a *C. pneumoniae* szeropozitív emberek szérumai is mutatják, melyek tartalmaznak LcrE specifikus ellenanyagokat [353]. Mivel az antitest izotípus profil, azaz a magas IgG2a/lgG1 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 ellenanyagszint 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-γ szekretáló sejtek meghatározását a vakcináció protektív hatásának markerének tekintik [354]. A sejt-mediálta immunitás kimutatása lymphocyta proliferációs teszt segítségével azt sugallta, hogy mindkét immunizálási mód képes kiváltani hasonló szintű T-sejt közvetítette választ. Hasonlóan Thorpe és mtsai munkájához, akik egy *C. pneumoniae* fehérjét (ID Cpn0029) használtak az immunizálásra CFA-val kombinálva [355]. Kísérletükben nagymértékű protekciót mértek és protein specifikus $CD4^+$ és $CD8^+$ IFN-γ termelő sejteket azonosítottak az állatok lépében. Azt fontos megjegyezni, hogy a Thorpe és csoportja által használt LcrE protein (ID CPn0029 molekula súlya: 14.32 kDa) nem azonos az általunk vizsgált *C. pneumoniae* LcrE fehérjével (GenBank ID 15618244, CPn0324 molekulasúlya: 43.42 kDa). Bár az Alum adjuvánsról azt tartják, hogy főleg a humorális immunválaszt fokozza a Th2-es sejtek aktiválásával, az irodalomban vannak olyan tanulmányok, amelyek beszámolnak arról, hogy az Alummal formulált vakcinák, pl. a malária altípus vakcina kiváltotta a Th-1-es immunválaszt [356], hasonlót tapasztaltak influenza vakcina esetén is [357]. Összefoglalva azt mondhatjuk, hogy az LcrE immunizáció Alum adjuvánssal kombinálva hasonló védelmet nyújtott *C. pneumoniae* fertőzés ellen, mint a Freund adjuvánssal adott protein, annak ellenére, hogy különbség mutatkozott az indukált IgG

izotípus között viszont az IFN-γ szekretáló sejtek tekintetében nem volt különbség. A protektív hatás jól érzékelhető volt, mivel szignifikánsan csökkent a visszatenyészthető chlamydia mennyisége a tüdőben, és IFN-γ termelő sejtek is indukálódtak. Ezek alapján az LcrE fehérje egy lehetséges komponense lehet egy későbbiekben kifejlesztett multi-subunit vakcinának. A különböző *C. pneumoniae* antigének formulálása Alum adjuvánssal segíthet azonosítani a protektív jelölteket és megtervezni egy multi-subunit vakcinát, mely képes az optimális védelem indukálására a *C. pneumoniae* fertőzés ellen.

A pGP3 és pGP4 plazmid fehérjék szerepe, protektív hatásának vizsgálata C. muridarum fertőzés során

Annak tisztázására, hogy vajon a különböző egértörzsek eltérő módon reagálnak-e a chlamydia fertőzésre, valamint a chlamydia vakcinára irányuló immunválaszban mutatnak-e variabilitást, a kísérleteink során két egértörzs, a C57BL/6N és a BALB/c érzékenységét vizsgáltuk *C. muridarum*mal szemben. Az egereket intranasálisan fertőztük $1x10^3$ IFU *C. muridarum*mal és feláldoztuk a fertőzést követő 1., 7., 14., 28. és 56. napon. A BALB/c egerek a fertőzést követő első naptól súlyosabb klinikai tüneteket mutattak, mint a C57BL/6N egerek, melyet borzolt szőrük, passzivitásuk, étvágytalanságuk és a súlyvesztésük mutatott. A visszatenyészthető *C. muridarum* mennyiségét indirekt IF teszt segítségével határoztuk meg. A BALB/c egerekben a *C. muridarum* titere az első napra már emelkedett és a 7. napon érte el a csúcspontját és aztán folyamatosan csökkent. A 28. napon a *C. muridarum* titere $3x10^1$ IFU/tüdő volt, viszont a fertőzést követő 56. napon már nem tudtunk kimutatni élő chlamydiát a tüdőkből. A C57BL/6N egerekben a legtöbb chlamydiát ugyancsak a 7. napon detektáltuk, viszont a 28. napon nem sikerült egyetlen egérből sem élő chlamydiát kimutatni, ezzel szemben az összes BALB/c egér még pozitívnak mutatkozott ezen időpontban a visszatenyésztés során **(43. ábra).**

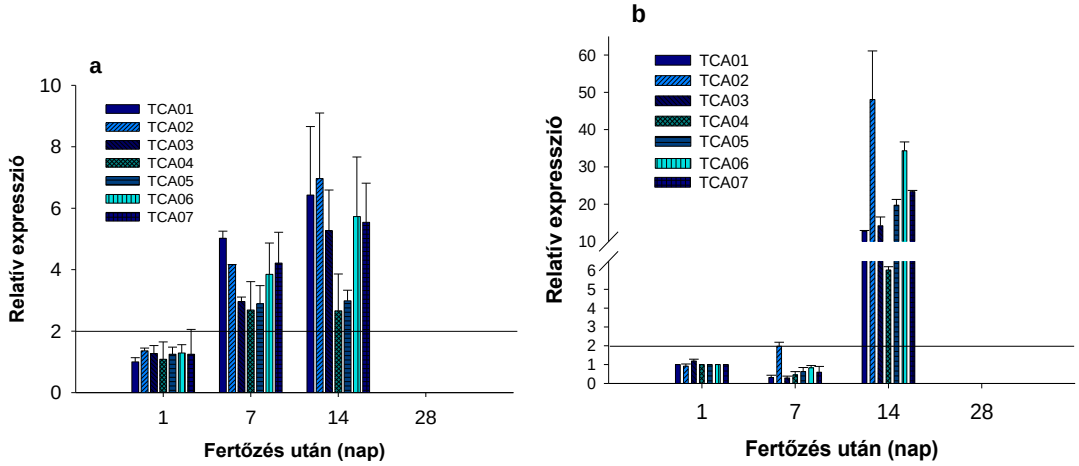


43. ábra. *A visszatenyészthető C. muridarum IFU-k száma fertőzött BALB/c és C57BL/6N egerek tüdejében. Az adatok, minden időpontban 7 egér tüdejében mért C. muridarum titerek átlagai ±SD; *P=0.007.*

MoPn plazmid gének expressziója különböző genetikai hátterű egerekben

Emelkedett génexpressziót figyeltünk meg a különböző plazmid gének esetén a fertőzést követő 7. napon a BALB/c egerekben. A TCA01, TCA02, TCA03, TCA06 és TCA07 gének kifejeződése 3-5-ször magasabb volt ebben az időpontban a kontrollhoz képest, és a kifejeződésük 5-7-szeresre emelkedett a 14. napra. Érdekes módon a TCA04 és TCA05 gének

kifejeződése 3-szoros volt a 7. és 14. napon is **(44A ábra)**. Ez az eredmény azt sugallta, hogy a két gén kapcsolatban lehet egymással. Nemrégiben látott napvilágot Song és munkatársai vizsgálata [164], amelyben beszámoltak arról, hogy a pGP4 protein szabályozza a plazmid kódolt pGP3 protein és sokféle más kromoszomális gén kifejeződését a *C. trachomatis* fertőzés során. Ráadásul az is bizonyítást nyert, hogy a pGP3-at kódoló 30 nukleotidot tartalmazó szekvenciája szükséges a pGP4 optimális expressziójához [358]. A C57BL/6N egerekben a MoPn plazmid gének kifejeződése a BALB/c egerekéhez viszonyítva késett. A 14. napon viszont a MoPn gének expressziója 7-47-szerese volt a BALB/c egerekben megfigyeltnek **(44B ábra)**. Plazmid specifikus génexpressziót nem tudtunk kimutatni a 28. naptól egyik egértörzsben sem.



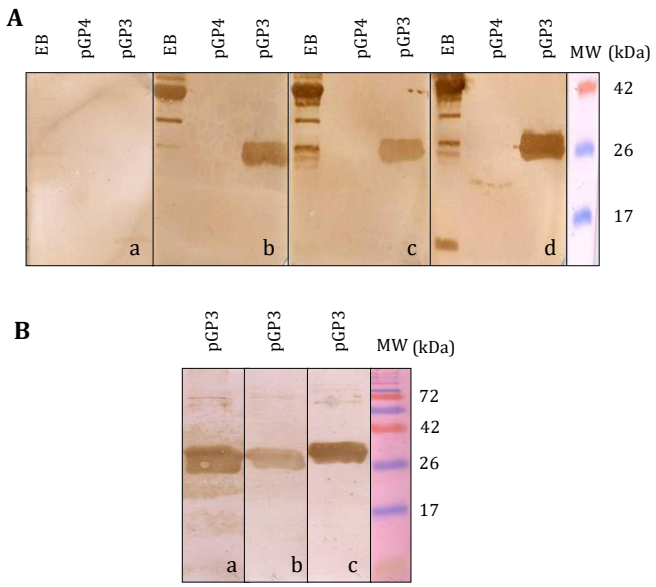
44. ábra. *A különböző pMoPn gének kifejeződése C. muridarummal fertőzött BALB/c és C57BL/6N egerek tüdejében. A tüdőkből teljes RNS kivonást végeztünk, majd plazmid specifikus primereket használva RT qPCR analízissel vizsgáltuk a génexpressziókat. Különböző időpontokban mért pMoPn génexpressziós szintek a BALB/c* ***(A)*** *és a C57BL/6N* ***(B)*** *egerek tüdejében. Az adatokat a 16S rRNS tartalomra normalizáltuk és a kontroll egerekben (4 órával a fertőzés után áldoztuk fel) mért expresszióhoz viszonyítottuk. A vonal az általunk meghatározott szignifikancia küszöböt mutatja.*

A pGP3- és pGP4-specifikus ellenanyagok termelődése és a C. muridarum fertőzött egerek által felismert proteinek azonosítása

A kísérleteink során a pGP4 protein szerepét próbáltuk kideríteni, ugyanis korábban ennek a proteinnek nem vizsgálták az immunogenitását. A pGP4 fehérje kódolásáért felelős gén a pGP3-at kódoló TCA04 gén közelében található, így azt feltételeztük, hogy a pGP4 fehérjének szerepe lehet a pathogén által okozott kórkép mechanizmusában. A pGP3 proteint a kísérleteink során kontrollként használtuk, mivel ezen fehérje immunogenitását *C. trachomatis* fertőzést követően már korábban leírták [162].

Annak tisztázására, hogy termelődnek-e pGP3 és pGP4 specifikus ellenanyagok *C. muridarum*-mal fertőzött egerekben, C57BL/6N és BALB/c egerek csoportjait fertőztük három alkalommal *C. muridarum*mal négy hetes időközönként. Csoportonként 10 egeret a fertőzést követő 14 nap múlva feláldoztunk, a vérüket begyűjtöttük, és a szérumokkal Western blot vizsgálatot végeztünk. A blot során antigénként az általunk előállított rekombináns pGP3 és pGP4 fehérjéket használtuk, kontrollként fertőzetlen egerek szérumát alkalmaztuk. A C57BL/6N

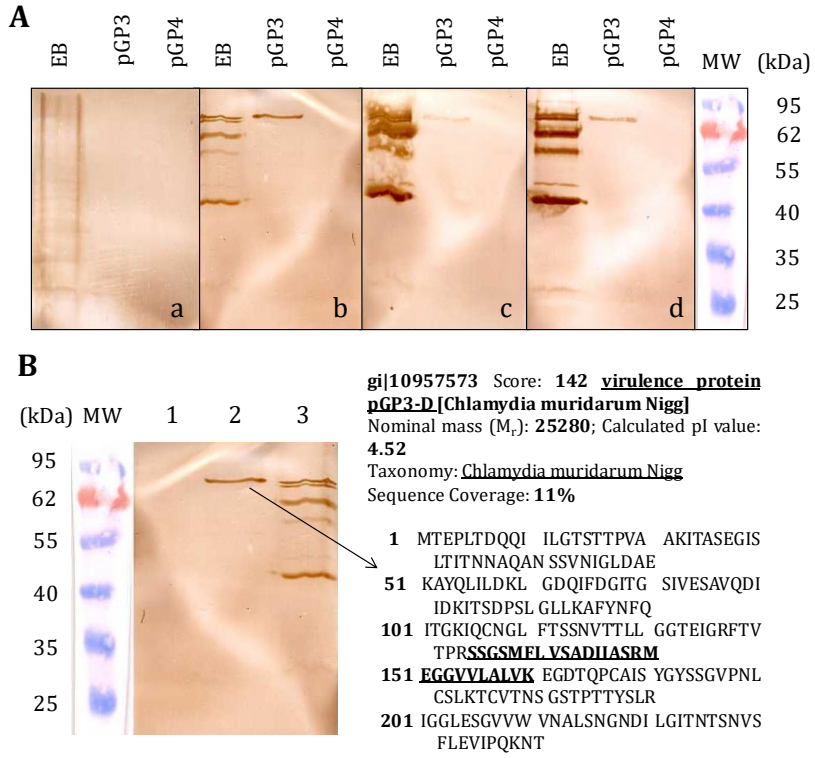
egerekben az egyszeri *C. muridarum* fertőzés indukálta a pGP3 specifikus ellenanyagok termelődését. Az egyszer, illetve kétszer fertőzött állatokban nem tudtunk pGP4 specifikus ellenanyagot kimutatni, viszont a háromszor fertőzött egerekben a Western blot vizsgálat során kimutattuk a specifikus ellenanyagok jelenlétét **(45A ábra, d panel)**. A Western blot analízis alapján valamennyi háromszor fertőzött állat rendelkezett pGP4 specifikus ellenanyaggal, ugyanis a vizsgálatot elvégeztük külön-külön minden állat szérumával, melyek reaktivitást mutattak a tesztben. A *C. muridarum* fertőzött egerek széruma jól reagált a koncentrált, lizált *C. muridarum* EB-kkel **(45 ábra, b,c,d panel)**.



45. ábra. *pGP3 és pGP4 specifikus ellenanyagok vizsgálata 1-3 alkalommal C. muridarummal fertőzött C57BL/6N egerek esetén.* ***A:*** *2 μg C. muridarum EB-t vagy pGP4 vagy pGP3 rekombináns proteint vittünk fel a gélbe. Az elektroforézist követően, membránra blotoltuk, és 1x (b panel), 2x (c panel), 3x (d panel) fertőzött C57BL/6N egerek szérumával kezeltük; kontrollként fertőzetlen C57BL/6N egerek széruma szolgált (a panel).* ***B:*** *Az 1x (a panel), 2x (b panel) vagy 3x (c panel) C. muridarummal fertőzött egerek szérumai a pGP3 28 kDa-os monomer formájával reagáltak.*

A *C. muridarum*mal inokulált BALB/c egerek szérumai eltérően a C57BL/6N egerektől nem reagáltak a 28 kDa molekulatömegű pGP3, valamint a pGP4 fehérjékkel sem. Viszont mind az egyszer, mind pedig a több alkalommal *C. muridarum*mal oltott egerek szérumai felismertek és kötődtek egy kb. 80-85 kDa molekulasúlyú fehérjéhez **(46A ábra, b,c,d panel)**. Az egyszer vagy többször oltott C57BL/6N egerek szérumai viszont nem reagáltak ezzel a nagyobb méretű proteinnel **(45B ábra)**. Már korábban is leírták azt a tényt, hogy a pGP3 protein dimer és trimer formában is előfordul [359]. Azért, hogy meggyőződhessünk arról, hogy a felismert protein ténylegesen a trimer pGP3, a csíknak megfelelő gél részletet LC-MSMS tömegspektrometriás vizsgálatnak vetettük alá. A vizsgálat eredményeit további analízissel megerősítettük, mellyel bizonyítottuk, hogy a *C. muridarum*mal fertőzött BALB/c egerek széruma a pGP3 protein trimer (84 kDa) formájával reagált **(46B ábra)**. A fertőzetlen BALB/c egerek széruma nem

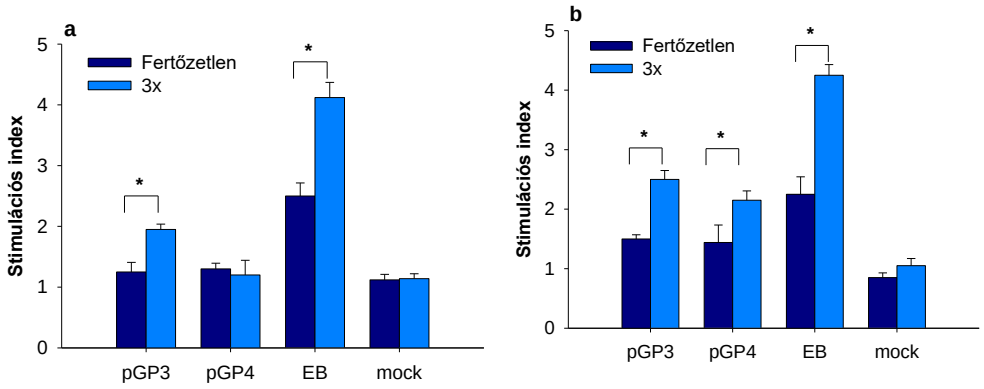
reagált a monomer pGP3 és pGP4 proteinekkel, valamint a teljes *C. muridarum* lizátummal sem a Western blot tesztben **(46A ábra, a panel)**.



46. ábra. *pGP3 és pGP4 specifikus ellenanyagok vizsgálata 1-3 alkalommal C. muridarummal fertőzött BALB/c egerek szérumában.* ***A:*** *C. muridarum EB-t vagy pGP4 vagy pGP3 proteint vittünk fel a gélbe. Az elektroforézist követően a mintákat blotoltuk, és 1x (b panel), 2x (c panel), 3x (d panel) fertőzött BALB/c egerek szérumával kezeltük; kontrollként fertőzetlen egerek széruma szolgált (a panel).* ***B:*** *A proteinek azonosítása. Azt a protein csíkot, mely megfelelt annak a proteinnek, amivel a C. muridarum fertőzött BALB/c egerek széruma reagált, kivágtuk a gélből és LC-MSMS vizsgálatnak vetettük alá. A peptid fragmenseket amelyek meghatározták a keresett proteint, aláhúzással jelöltük.*

A pGP3 és pGP4 specifikus celluláris immunválasz

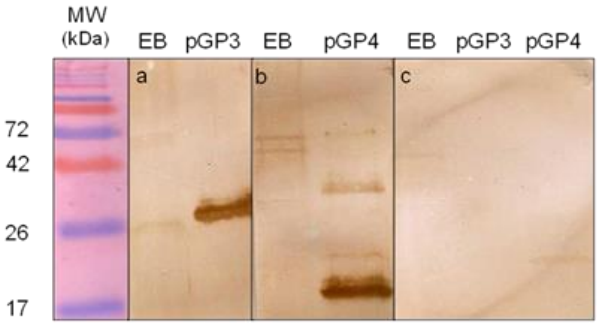
Abból a célból, hogy összehasonlíthassuk a két egértörzsben kialakult pGP3 és pGP4 specifikus T-sejt választ *C. muridarum* fertőzést követően, lymphocyta proliferációs vizsgálatot végeztünk. Háromszor *C. muridarum*mal oltott egerek lépsejtjeit *in vitro* rekombináns pGP3 vagy pGP4 fehérjével, hőinaktivált *C. muridarum* EB-kkel vagy mock antigénnel stimuláltuk. Fertőzetlen egerek lépsejtjei szolgáltak kontrollként. A fertőzött BALB/c egerek lépsejtjei nem mutattak reaktivitást a pGP4 proteinre, de felismerték a pGP3 fehérjét és proliferációval reagáltak 72 óra inkubációs időt követően az *in vitro* restimuláció során **(47a ábra).** A stimulációs index szignifikánsan magasabb volt az *in vitro* pGP3, illetve pGP4 restimulált, *C. muridarum* fertőzött C67BL/6N egerekben, mint a kontroll csoportban ($P<0.05$) **(47b ábra)**. Mindkét egértörzs lépsejtjei proliferációval válaszoltak a hőinaktivált *C. muridarum* EB-re.



47. ábra. *Három alkalommal (3x) C. muridarummal fertőzött egerek pGP3 és pGP4 specifikus celluláris válaszának vizsgálata MTT teszttel. A BALB/c **(a)** és C57BL/6N **(b)** egerek lépsejtjeit az utolsó fertőzést követően két héttel eltávolítottuk és in vitro pGP3, pGP4, hőinaktivált C. muridarummal (EB) vagy mock antigénnel stimuláltuk. Fertőzetlen egerek szolgáltak kontrollként. Az oszlopok a stimulációs indexeket mutatják. Az adatok három kísérletnek az átlagát±SD mutatják. A BALB/c esetében **(a):***P=0.03; P<0.001. A C57BL/6N esetében **(b):***P=0.012; P=0.025; P=0.02.*

A pGP3 és pGP4 plazmid fehérjék protektív hatásának vizsgálata C. muridarum fertőzés során C57BL/6N egerekben

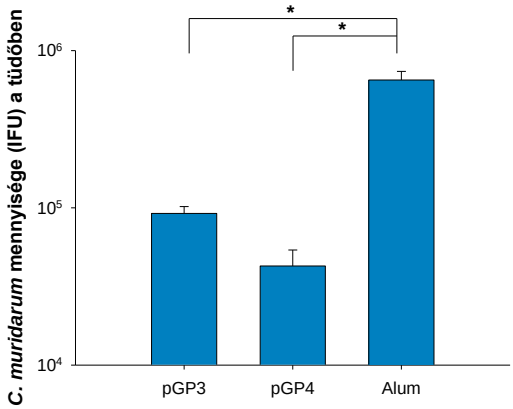
Annak érdekében, hogy megtudjuk, vajon a pGP3 és pGP4 fehérjék kiváltanak-e protektív immunválaszt *C. muridarum*mal szemben, C57BL/6N egereket subcutan módon immunizáltuk 3 alkalommal 3 hetes időközökkel az általunk előállított rekombináns pGP3 és pGP4 proteinekkel. Adjuvánsként Alumot használtunk, melyről bizonyítottuk korábban, hogy az általa biztosított immunválasz hasonló a Freund adjuvánséhoz. A kialakult humorális immunválasz kimutatására Western blot vizsgálatot végeztünk, melyben az utolsó immunizálást követő két héttel vett szérumokat használtuk. A teszt során antigénként pGP3 és pGP4 proteineket alkalmaztunk, negatív kontrollként pedig a csak Alummal oltott egerek szérumai szolgáltak. A többszöri immunizálás pGP3 vagy pGP4 fehérjékkel indukálta a specifikus ellenanyagok termelődését **(48. ábra, a,b panel)**. A pGP3 és pGP4 immunizált egerek szérumai nem reagáltak a teljes chlamydiát tartalmazó EB lizátummal. A kontrollként használt Alum oltott egerek széruma nem kapcsolódott a pGP3 és pGP4 proteinekhez és az EB lizátumhoz sem a tesztben **(48. ábra, c panel).**



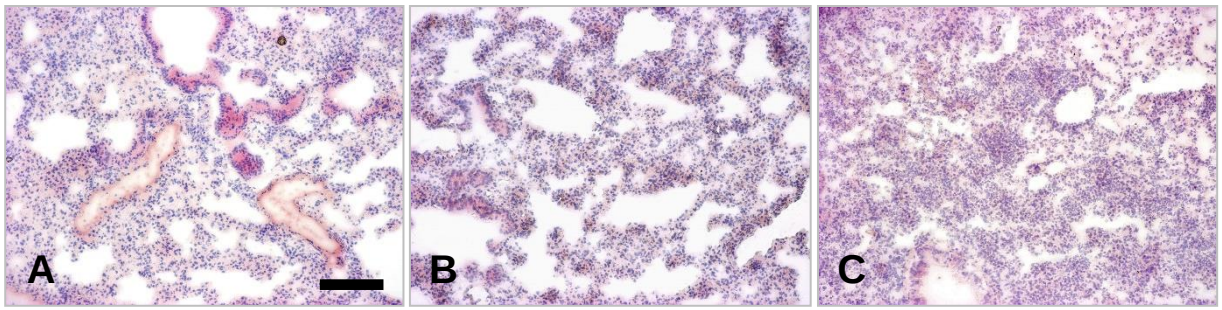
48. ábra. *Három alkalommal pGP3 vagy pGP4 proteinnel immunizált egerek pGP3 és pGP4 specifikus ellenanyagainak kimutatása. A denaturáló gélbe C. muridarum EB-t, vagy pGP3 vagy pGP4 proteint vittünk fel. Az elektroforézist és blottolást követően a membránokat pGP3 **(a panel),** pGP4 **(b panel)**, vagy csak Alum adjuváns oltott egerek szérumával **(c panel)** kezeltük.*

Két héttel az utolsó immunizálást követően az egerek egy másik részét megfertőztük intranasálisan *C. muridarum*mal, hogy megtudhassuk, hogy a pGP3 és pGP4 specifikus immunválasz képes volt-e megvédeni az egereket a *C. muridarum* fertőzéstől. A fertőzést

követő 4. és 7. napon a nem immunizált állatokban a súlycsökkenés 8.5±0.2% és 10.2±0.3% volt, ezzel szemben az immunizált állatok súlya nem változott a fertőzést követően. A pGP3 és pGP4 védőhatását az egerek tüdejéből visszatenyészthető *C. muridarum* mennyiségével mértük. Az egerek immunizálása a rekombináns fehérjékkel szignifikánsan csökkentette a chlamydiák számát az egerek tüdejében függetlenül attól, hogy melyik proteinnel immunizáltuk az egereket. A baktérium mennyiségének csökkenése a pGP3 immunizálást követően kb. 1 log, míg a pGP4-gyel történt vakcinálás után több mint 1 log volt a kontrollként használt csak Alummal kezelt egerekben mérthez képest **(49. ábra)**. A gyulladásos beszűrődés a tüdőben jelentősen csökkent mind a pGP3, mind a pGP4 proteinekkel immunizált egerekben a kontrollokéhoz képest **(50. ábra)**. Az alveoláris szerkezet tisztán felismerhető az immunizált egerek tüdőmetszetein, a kontroll tüdőmetszetekben nem.

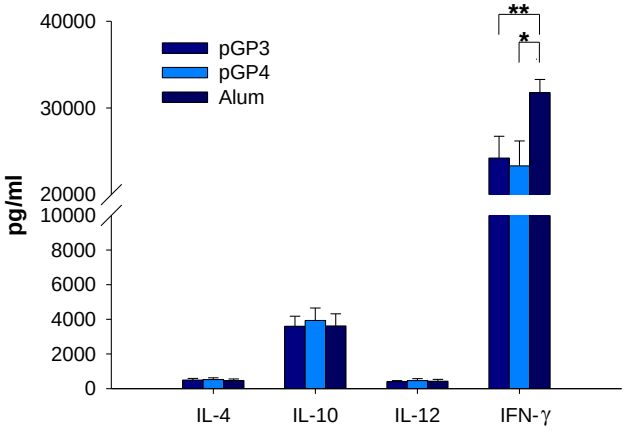


49. ábra. *A pGP3 és pGP4 proteinekkel immunizált egerekből visszatenyészthető C. muridarum mennyisége a fertőzést követően. Az egereket az utolsó immunizálás után két héttel 2 x 10^3 IFU C. muridarummal fertőztük, majd a fertőzés után egy héttel feláldoztuk. Az oszlopok 10-10 egér tüdejének átlagos C. muridarum titer±SD értékét mutatják *P<0.001.*



50. ábra. *A tüdőszövetben bekövetkezett pathológiás változások kimutatása H&E festéssel. A pGP3* ***(A)*** *vagy pGP4 immunizált* ***(B)*** *és az Alum oltott* ***(C)*** *egerek tüdejét a C. muridarum fertőzést követően 7 nappal megmetszettük és H&E-nal festettük.*

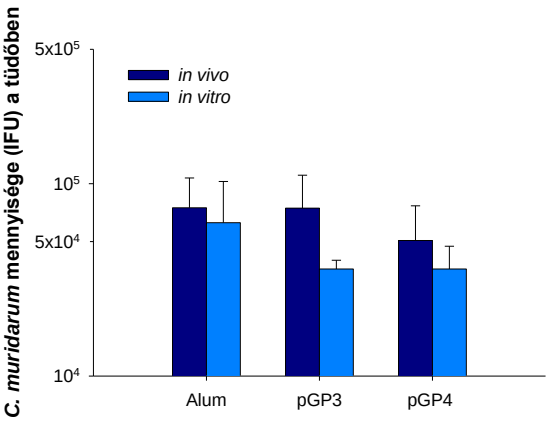
A lehetséges vakcina jelölteknek két fontos kritériumnak kell megfelelniük: egyrészt aktiválniuk kell a szervezet immunválaszát, de másrészt olyan módon, hogy később, a természetes úton történt fertőzés során ne indukáljanak pathológiás mértékű gyulladást. A gyulladás nagyságának vizsgálatára ELISA rendszerben teszteltük a fehérjével immunizált és csak Alum-kezelt, majd fertőzött egerek tüdő felülúszóinak IL-4, IL-10, IL-12, és IFN-γ tartalmát. Nem mutatkozott szignifikáns különbség az immunizált és a kontroll csoport között a tüdő felülúszók IL-4, IL-10 és IL-12 koncentrációja között. Az IFN-γ szintje azonban szignifikánsan alacsonyabb volt az immunizált csoportokban a kontrollhoz viszonyítva **(51. ábra)**.



51. ábra. *A pGP3 vagy pGP4 vagy Alum immunizált egerek tüdejének gyulladásos cytokin tartalma a C. muridarum fertőzést követően. A tüdőszuszpenziókból ELISA módszerrel meghatároztuk az IL-4, IL-10, IL-12 és IFN-γ szinteket. Az adatok 10 egér tüdejében mért szintek átlagai±SD. *P=0.004;** P=0.011.*

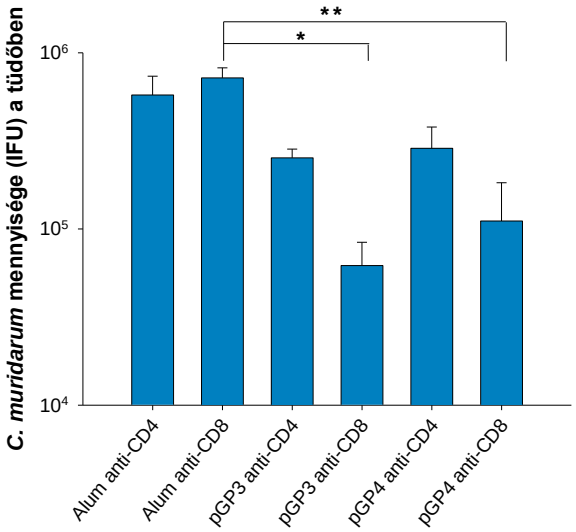
A pGP3 és pGP4 specifikus ellenanyagokkal történt passzív immunizálás és a pGP3 és pGP4 specifikus lépsejt transzfer hatása a C. muridarum fertőzés kimenetelére

A kísérletünk során azt az eredményt kaptuk, hogy a pGP3 és pGP4 immunizálás specifikus ellenanyag termeléshez vezetett, ezt követően arról is információt akartunk kapni, hogy rendelkeznek-e ezek az ellenanyagok protektív, neutralizáló hatással. A *C. muridarum in vivo* neutralizálásának céljából a háromszor pGP3, illetve pGP4 immunizált, valamint a kontroll egerek szérumait intraperitoneálisan naiv állatokba oltottuk a *C. muridarum* fertőzést megelőzően, majd a fertőzést követően. Az állatokat a fertőzést követő 7. napon feláldoztuk, és a tüdejüket feldolgoztuk az élő chlamydia kitenyésztésére. Az immunszérummal kezelt állatok élő *C. muridarum* titere nem különbözött a kontroll szérummal kezelt állatokétól **(52. ábra)**. Annak tisztázására, hogy esetleg az immunszérumok képesek direkt a chlamydia EB-khez kötődni, és ilyen formában megakadályozni a fertőzést, *in vitro* inkubáltuk az EB-ket pGP3, pGP4 specifikus, illetve kontroll egerek szérumával, majd az *in vitro* ”közömbösített”chlamydiát intranasálisan az állatokba juttattuk. Az eredmény az előző vizsgálathoz hasonlóan negatív volt, vagyis az ellenanyaggal *in vitro* kezelt EB-kkel oltott egerekben sem csökkent a visszatenyészthető chamydia mennyisége **(52. ábra)**. Mivel nem tudtunk kimutatni neutralizáló aktivitást a pGP3 vagy pGP4 proteinekkel immunizált egerek szérumában, úgy véltük, hogy a protektív hatásért a pGP3 és pGP4 specifikus celluláris immunválasz tehető felelőssé



52. ábra. *A C. muridarum in vitro és in vivo neutralizálása pGP3 vagy pGP4 vagy Alum oltott egerek szérumával. A naiv egereket in vivo kezeltük az immunizált egerek szérumával a fertőzés előtt és után. Az egerek egy másik csoportját olyan C. muridarum EB-kkel oltottuk, melyeket in vitro inkubáltunk előzetesen immunizált egerek szérumával. Az egereket a fertőzést követő 1. héten leöltük, és meghatároztuk a visszatenyészthető C. muridarum mennyiséget a tüdőben. Az oszlopok 10 egér C. muridarum titerének átlagát±SD jelölik.*

Ennek bizonyítására rekombináns plazmid proteinnel immunizált, valamint kontroll egerek lépsejtjeiből deplécióval eltávolítottuk a $CD4^+$ vagy $CD8^+$ sejteket *in vitro*, majd ezt követően a lépsejteket naiv egerekbe vittük át. Az adoptív transzfert követő 24 óra múlva az egereket megfertőztük *C. muridarum*mal. A pGP3 és a pGP4 specifikus anti-CD8 ellenanyaggal kezelt sejtek szignifikánsan csökkentették a chlamydia mennyiségét a kontroll egerekhez képest **(53. ábra).** Abban az esetben, ha az adoptív transzfert olyan lépsejtekkel végeztük, melyeket előzetesen anti-CD4 ellenanyaggal kezeltünk, nem csökkentették a visszatenyészthető chlamydia mennyiségét.



53. ábra. *A visszatenyészthető C. muridarum mennyisége a lépsejtek adoptív transzferét követően. Naiv egereket kezeltünk pGP3 vagy pGP4, illetve Alum immunizált egerek lépsejtjeivel $CD4^+$, illetve $CD8^+$ sejtek depléciója után. A transzfert követő első napon az egereket fertőztük C. muridarummal, majd 1 hét múlva az állatokat feláldoztuk és meghatároztuk a tüdejükből a visszatenyészthető C. muridarum mennyiséget. Az oszlopok 10 egér tüdejéből visszatenyészthető chlamydia mennyiség átlagát±SD-t jelölik. *P=0.029;**P<0.001. (Alum anti-CD4 vagy Alum anti-CD8 = csak Alummal kontrollként oltott állatok depletált lépsejtjei)*

A *C. trachomatis* szerovariáns A, B, D, L1 és L2, valamint a *C. muridarum* Nigg törzsének a plazmidját már korábban szekvenálták [52][160][360][361][362]. A szekvencia azonosság a plazmidokban aminosav szinten nagyobb, mint 96%, a különböző *C. trachomatis* szerovariánsok és a *C. muridarum* között pedig 82% [150]. Ezen kriptikus plazmidot mint a *C. trachomatis* virulencia faktorát tartják számon, mivel a ritkán talált, plazmidmentes *C. trachomatis* formák kevésbé invazívak és kevésbé súlyos pathológiás elváltozást okoznak az egerek felső genitális szöveteiben [363]. A *C. muridarum* plazmid elvesztése két virulenciával kapcsolatos fenotípusra van hatással, a fertőzőképességre és a TLR aktivációra, valamint a chlamydia glikogén akkumulációs képességére [159]. A chlamydia plazmid gének expressziós kinetikáját korábban még nem vizsgálták különböző egértörzsekben. Kísérleti eredményeink megerősítették azt a korábban leírt tényt, hogy a BALB/c egerek érzékenyebbek magára a chlamydia fertőzésre, mint a C57BL/6N egerek [364]. 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 [163]. A különböző haplotípussal rendelkező egerek, mint pl. a C3H/HeN, C57BL/6N, BALB/c és DBA/2 különböző módon válaszolnak a légúti chlamydia fertőzésekre [365][366][367]. Ráadásul a BALB/c egerekről leírták, hogy bennük nagyobb számban vannak IL-4 termelő T-sejtek, melyek az $NK1.1^{+}$ sejteknek felelnek meg, ezzel ellentétben a C57BL/6N egerek főleg IFN-γ szekretáló NK és NKT sejtekkel rendelkeznek [368][369]. 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*mal háromszor fertőzött egerek széruma kötődött a pGP4 proteinhez is a teszt során. Ezzel ellentétben a több alkalommal *C. muridarum*mal fertőzött BALB/c egerek széruma nem reagált a pGP3 monomer formájával, viszont erősen kapcsolódott egy magasabb molekulasúlyú fehérjéhez (80-85 kDa). Mivel a pGP3 plazmid proteinről már korábban leírták, hogy trimer formában is létezik és ennek molekulasúlya 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. Li és munkatársai beszámoltak arról, hogy urogenitális fertőzés során a pGP3 trimer formaként szekretálódik a citoszolba, a humán szérum csak a trimer formával reagált a monomerrel pedig nem, ennek megfelelően szerintük a pGP3 trimer formában kerül prezentációra [163]. Mások azonban úgy találták, hogy a chlamydia szeropozitív humán szérum a monomer pGP3 formával reagált [370]. A C57BL/6N egerekben az első fertőzés után már megjelent a monomer pGP3 specifikus ellenanyag termelés. A pGP4 specifikus ellenanyagválasz viszont csak a harmadik fertőzést követően fejlődött ki, ami arra utal, hogy az ismételt fertőzés vezet az antigén jobb prezentációjához, és így az ellenanyag termeléshez. Ráadásul nem csak a kevert egér szérumok reagáltak a pGP4 proteinnel a Western blot tesztben, hanem az individuális egerek széruma is, ami azt sugallja, hogy a pGP4 fehérje mint antigén feldolgozása, felismerése létrejött minden egyes C57BL/6N egérben. Eredményeink azt bizonyítják, hogy a gazda genetikai háttere meghatározza, hogy a pGP3 monomer vagy trimer formája kerül-e felismerésre. Emellett beszámoltunk arról, hogy a fertőzött C57BL/6N egerek *in vitro* pGP3 és pGP4 stimulált lépsejtjei proliferációt mutattak. A celluláris reaktivitás a BALB/c egerekben hasonlónak 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 és feladata ismert, viszont a pGP4 plazmid fehérje tekintetében meglehetősen kevés információ áll a rendelkezésre. A pGP4 protein 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 adjuvánsra, mivel korábbi kísérleteink során összehasonlítottuk az LcrE chlamydia fehérje immunogenitását Alum, illetve Freund adjuváns kíséretében, és azt az eredményt kaptuk,

hogy az Alum hasonló védelmet indukált, mint a Freund adjuváns (bár a kialakult immunválasz között különbségek mutatkoztak az IgG szubtípusok tekintetében). Az Alum adjuváns használatának előnye, hogy nem okozott súlyos szöveti károsodásokat az egerekben [164]. Western blot vizsgálattal igazoltuk, hogy a pGP3 és pGP4 proteinekkel többszörösen immunizált egerek széruma tartalmaz plazmid protein specifikus ellenanyagokat. Viszont a pGP3 vagy pGP4 immunizált egerek széruma nem reagált az EB-k lizátumával a Western blot vizsgálatban. Azt már korábban is leírták, hogy a pGP3 protein nagyon kis mennyiségben van jelen az EB-kben és már a fertőzést követő 24 órától szekretálódik az összes kriptikus plazmidot hordozó chlamydiából [163]. Így azt gondoljuk, hogy a Western blot tesztünk nem elég érzékeny ilyen kis mennyiségű proteinnel reagáló ellenanyag kimutatására. Viszont a rekombináns plazmid proteinekkel történt immunizálás protektív immunválaszt alakított ki az egerekben. A pGP4 proteinnel történt immunizálás hasonló mértékben csökkentette a visszatenyészthető chlamydia mennyiségét, mint a pGP3 protein. A pGP3 immunológiai szerepét korábban Donati és csoportja tanulmányozta, akik DNS immunizálási technikát alkalmaztak a *C. trachomatis pgp3* gén bejuttatására C3H/HeN egerekbe, és azt tapasztalták, hogy az immunizálás megakadályozta a chlamydia terjedését az alsó genitális traktusból a felsőbe [148]. Ezen túlmenően a pORF5 vakcina intranasális adagolása robusztus celluláris és humorális immunválaszt indukált és szignifikánsan gyorsította a genitális fertőzés gyógyulási folyamatát, és az immunizált állatokban csak minimális pathológiás elváltozások jöttek létre a petevezetékben [371]. Bár a modellünk meglehetősen különbözött ettől; más egértörzset, más chlamydia fajt használtunk, és az immunizálás módja is más volt, hasonló protekciót tudtunk kialakítani, vagyis a visszatenyészthető chlamydiák száma hasonló módon csökkent a fertőzés után 1 héttel. 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 transzkripciós regulátora [164]. A mikroorganizmusok világában viszont nem egyedi, hogy egy funkcionális protein protektív választ indukál. Korábban kutatócsoportunk is beszámolt arról, hogy a CMV funkcionális proteinje (immediate early protein, IE) immunogén, és humorális választ, valamint celluláris, IE specifikus cytotoxikus $CD8^+$ T-lymphocyták termelődését indukálja [372]. Kísérletünkben az immunizált egerek tüdejében a gyulladás nagysága is csökkent, amelyet jól jelzett a csökkent IFN-γ mennyisége a tüdőszuszpenzió felülúszóban. Hogy kiderítsük, az immunrendszer melyik típusa felelős a pGP3 és pGP4 specifikus protektív válaszért, *in vivo* és *in vitro* neutralizációs kísérletet terveztünk. Sem a pGP3, sem pedig a pGP4 protein nem indukálta neutralizáló ellenanyagok termelését, a visszatenyészthető *C. muridarum* száma nem változott az ellenanyaggal 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 [373].

Az adoptív transzfer kísérletünkkel bizonyítottuk, hogy a pGP3 és a pGP4 plazmid proteinek védő hatásáért a $CD4^+$ sejtek felelősek. A pGP3 és pGP4 specifikus $CD4^+$ sejtek átvitele szignifikánsan csökkentette a visszatenyészthető chlamydia EB-k számát miután az egereket

C. muridarum fertőzésnek tettük ki. Ezen eredményeink támogatják azt a korábbi munkát, mely arról számolt be, hogy a $CD4^+$ lymphocytáknak elengedhetetlen szerepe van a chlamydia okozta betegségek megoldásában [374]. *C. trachomatis* genitális fertőzés esetén a $CD4^+$ T-sejtek aktiválódnak, proliferálnak és a genitális mucosába vándorolnak [375][376][377]. A $CD4^+$ sejtek fontos szerepét az is bizonyítja, hogy a CD4 génkiütött egerek fertőzése *C. trachomatis*szal növelte a primer fertőzés során a visszatenyészthető baktériumok számát, valamint csökkentette a protekciót a szekunder fertőzés során [375]. A közölt tanulmányok azonban nem mentesek az ellentmondásoktól a $CD4^+$ T-sejtek protektív hatásának tekintetében *C. trachomatis* fertőzés során. Az egyik kísérletben, melyben a *C. trachomatis* fertőzés lefolyását vizsgálták B-sejt hiányos microMT egerekben, valamint vad típusú társaikban, a $CD4^+$ T-sejtek szükségesnek bizonyultak a protektív immunitáshoz a szekunder fertőzés eredményes leküzdésében [378]. Ezzel ellentétben egy másik tanulmányban, ahol a $CD4^+$ sejteket deplécióval eltávolították, úgy találták, hogy a $CD4^+$ sejtek nem játszanak kritikus szerepet a humán törzsek eliminálásában [379]. A kísérletünkben azt tapasztaltuk, hogy a $CD8^+$ sejtek transzfere az immunizált egerekből naiv egerekbe nem csökkentette jelentősen a tüdőből visszatenyészthető chlamydia mennyiségét. Az MHC-I korlátozott cytotoxikus $CD8^+$ T-lymphocyták fontossága a chlamydiák elleni protektív immunitásban még bizonytalan, mivel sok ellentmondás van az *in vitro* és *in vivo* kísérletek között. Chlamydia fertőzést követően kialakult $CD8^+$ T-lymphocyták cytotoxikusnak bizonyultak *in vitro* tesztekben chlamydia fertőzött humán és állati eredetű sejtekre [380][381][382]. Néhány tanulmány szerint a $CD8^+$ T-sejtek mérhető védelmet képesek kialakítani [42], mások viszont arról számoltak be, hogy a hatásuk nagyon korlátozott [383][384].

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 plazmid protein specifikus ellenanyagok, hanem a $CD4^+$ sejtek tehetők felelőssé *C. muridarum* fertőzés folyamán. Munkánk eredménye fontos információkkal szolgálhat egy esetleges chlamydia elleni multi-subunit vakcina tervezése során.

Összefoglalás

Munkánk eredményeként az alábbi új megállapításokat tettük ebben a témában:

1. Bizonyítottuk, hogy a chlamydia LcrE proteinnel történt immunizálásra az egerek ellenanyag termeléssel reagálnak, a humorális immunválasz mellett a T-sejtes válasz is aktiválódik.
2. Bizonyítottuk továbbá, hogy az LcrE vakcina protektív hatással rendelkezik az immunizált egerekben, a fertőzést követően kevesebb *C. pneumoniae*t tudtunk kitenyészteni, mint az immunizálatlan állatokból.
3. Kimutattuk, hogy az LcrE antigénnel kapcsolatban az Alum adjuváns hasonló mértékben képes stimulálni az egerek immunválaszát, mint a Freund adjuváns.

4. Mindkét adjuváns alkalmazásával történt immunizálás indukált Th1 típusú immunválaszt az egerekben.
5. Megállapítottuk, hogy a különböző genetikai háttérrel rendelkező egerek, különböző formában ismerik fel a pGP3 chlamydia plazmid proteint, és arra ellenanyag termeléssel reagálnak.
6. Bizonyítottuk, hogy a chlamydia fertőzés során pGP3 specifikus T-sejtek képződnek a BALB/c egerekben, és pGP3 és specifikus T-sejtek indukálódnak a C57BL/6N egerekben.
7. Kimutattuk, hogy a rekombináns pGP3 és pGP4 proteinnel történt immunizálás specifikus ellenanyag képződéshez vezetett.
8. Bizonyítottuk, hogy a pGP3 és pGP4 immunizálásnak protektív hatása van a későbbi fertőzés során, az immunizált egerekben kisebb fokú gyulladás alakult ki, valamint a visszatenyészthető chlamydia mennyisége is csökkent.
9. Bizonyítottuk, hogy a pGP3 és pGP4 indukálta protekcióért nem a humorális, hanem a celluláris immunválasz felelős.

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

A chlamydiák okozta fertőzések sokszor nem kerülnek diagnózisra, így az alkalmazott antibiotikumok nem képesek teljesen gátolni a chlamydia szaporodását, valamint számolni kell az atibiotikum rezisztencia kialakulásával is, így amíg nem rendelkezünk hatékony, protektív vakcinával ellenük nagyon fontos lenne új, potenciális anti-chlamydiás szerek vizsgálata. A klinikai gyakorlatban számos olyan hatóanyag, készítmény használatos melyek hatással lehetnek a chlamydiák szaporodására, ezek ismerete fontos lehet a terápia hatékonyságának érdekében.

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* fertőzésre 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?

A *C. trachomatis* a szexuálisan átvihető bakteriális megbetegedések legfontosabb kórokozója a fejlődő és a fejlett országokban egyaránt, évenként kb. 90 millió új genitális fertőzést okozva. Hatékony, 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 [385]. Az AMP-k potenciálisan ígéretes jelöltek lehetnek erre a célra. Bár az antimikrobiális szerepük széles körben tanulmányozott gombák, protozoonok, baktériumok között, anti-chlamydiás szerepüket még nem vizsgálták [386]. A *Medicago truncatula* által termelt, majd szintetikus úton előállított több NCR (nodule cysteine-rich) peptidről bizonyítást nyert, hogy hatékonyan pusztítják el a különböző Gram-negatív (*E. coli*, *S. typhimurium*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas aeruginosa* és *Xanthomonas campestris*) és Gram-pozitív baktériumokat (*Bacillus megaterium, Bacillus cereus, Clavibacter michiganensis, Staphylococcus aureus* és *L. monocytogenes*), melyek között humán/állat, illetve növény pathogének is fellelhetők [387]. Más jellegű AMP-kről azt is leírták, hogy hatékonyak voltak a *Staphylococcus epidermidis* ellen *in vivo* egér modellben, valamint gyulladásellenes hatással is rendelkeztek [388].

A növényi eredetű peptidek anti-chlamydiás hatása

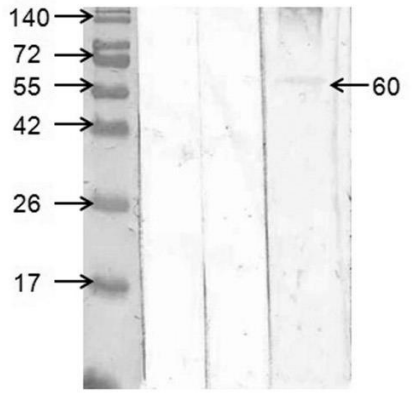
Annak vizsgálatára, hogy a növényi eredetű peptidek rendelkeznek-e anti-chlamydiás hatással 11 NCR peptidet (NCR030, NC0R44, NCR055, NCR095, NCR137, NCR168, NCR169, NCR183, NCR192, NCR247 és NCR280) inkubáltunk *C. trachomatis* EB-kkel. Az élő és visszatenyészthető

C. trachomatis inklúziók számolása alapján a 11 NCR peptidből 7 (NCR044, NCR055, NCR095, NCR183, NCR192, NCR247 és NCR280) rendelkezett kifejezett antimikrobiális hatással *in vitro* 10 μg/ml peptidet használva, az NCR030 és az NCR168 gyengébb aktivitást, viszont az NCR137 és az NCR169 nem mutatott anti-chlamydiás hatást. Ezt követően a *C. trachomatis* EB-ket különböző koncentrációjú peptidekkel kezeltük. A vizsgálat alapján azt kaptuk, hogy a legerősebb anti-chlamydiás hatással az NCR044, NCR055 és az NCR183 rendelkezett, ugyanis a legkisebb alkalmazott 1.25 μg/ml koncentrációban a *C. trachomatis* szaporodását 95-78%-kal csökkentették, míg a többi peptid ebben a koncentrációban nem mutatott antimikrobiális aktivitást. Az NCR192 és az NCR247 2.5 μg/ml koncentrációban mutatott szignifikáns anti-chlamydiás hatást. Ezt követően megvizsgáltuk az NCR044, NCR055, NCR183 és NCR247 peptidek antimikrobiális hatásának időbeli lefolyását 5 μg/ml koncentrációjú peptidet alkalmazva. Az NCR044 peptid mutatta a leggyorsabb hatást, a visszatenyészthető chlamydia EB-k számát 80%-kal csökkentette már 15 perces inkubálás után. A másik három NCR peptidnek hosszabb idő kellett a chlamydia inaktiválásához.

Az NCR247 peptid kötődéséért felelős chlamydia ligand azonosítása

A továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy az anti-chlamydiás hatással bíró NCR247 peptid miképp kötődik a chlamydia EB-khez. Ennek kiderítésére koncentrált EB-ket szeparáltunk SDS-PAGE segítségével, a blotolást követően a membránokat NCR247 peptiddel, majd poliklonális nyúl anti-NCR247 IgG ellenanyaggal, ezt követően pedig HRP-jelölt anti-nyúl ellenanyaggal kezeltük. A kontrollként használt chlamydia EB-t tartalmazó membránt nem inkubáltuk NCR247 peptiddel, csak az előzőleg említett két ellenanyaggal. A szintetikus NCR247 peptid egy 60 kDa molekulasúlyú fehérjéhez kötődött **(54A ábra, 4. oszlop)**. A szintetikus NCR247 nem kötődött a mock antigénhez **(54A ábra, 2. oszlop),** és a chlamydia EB-k lizátuma nem reagált a HRP-jelölt anti-nyúl ellenanyaggal **(54A ábra, 3. oszlop).** A gélből kivágtuk a chlamydia EB-k lizátumának azon részét, mely a Far Western blot során kötődést mutatott, és további analízisre bocsátottuk. Az LC-MSMS tömegspektrometriás vizsgálat kimutatta, hogy a chlamydia 60 kDa-os GroEL fehérjéje felelős az NCR247 peptid kötődéséért **(54B ábra)**.

A



B

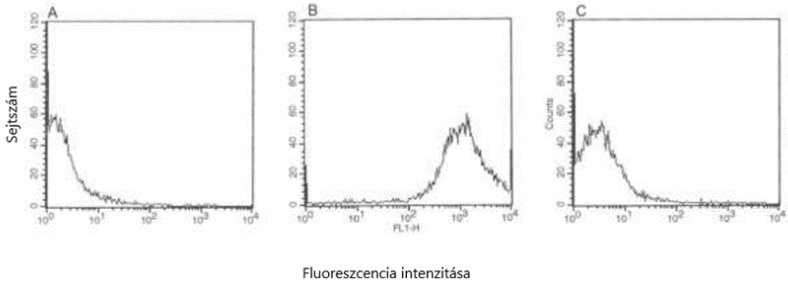
D7DCT1 Uniprot ID: D7DCT1_CHLTD Species: CHLTD Name: 60 kDa chaperonin
Organism: Chlamydia trachomatis serovar D (strain D-EC) Gene: groEL Existence: Inferred from homology Version: 1
Protein MW: 58147.4 Protein pI: 5.3 Protein Length: 544

Num Unique	% Cov	Best Disc Score	Best Expect Val
17	36.9	4.84	8.1e-8

m/z	z	Da	Peptide	RT	Start	End	Score	Expect
643.6846	3	0.040	EVELADKHENMGAQMVK	13.5501	59	75	18.6	0.015
615.7597	2	+0.051	NVTAGANPMDLK	15.3489	106	117	36.5	1.9e-5
911.0538	3	+0.066	EIAQVATISANNDAEIGNLIAEAM(Oxidation)EK	27.2683	143	168	26.1	7.9e-6
957.1231	3	+0.016	NGSITVEEAKGFETVLDIVEGMNFNR	35.3565	172	197	20.3	0.0027
928.9320	2	+0.014	GFETVLDIVEGM(Oxidation)NFNR	29.8399	182	197	46.0	2.4e-7
920.9175	2	+0.031	GFETVLDIVEGMNFNR	33.6069	182	197	49.1	8.1e-8
1122.8975	3	0.011	GYLSSYFATNPETQEC(Carbamidomethyl)VLEDALVLIYDKK	34.1365	198	226	22.8	1.6e-6
826.1337	3	0.028	KAM(Oxidation)LEDIAILTGGQLISEELGMK	31.5225	286	308	30.6	1.1e-6
820.7403	3	+0.034	KAMLEDIAILTGGQLISEELGMK	33.2856	286	308	37.2	4.5e-7
1173.6437	3	0.034	AM(Oxidation)LEDIAILTGGQLISEELGMKLENANLAM(Oxidation)LGK	35.7915	287	319	20.4	7.4e-4
1168.3364	3	0.058	AMLEDIAILTGGQLISEELGM(Oxidation)KLENANLAMLGK	37.7253	287	319	29.5	1.0e-6
1166.6025	2	+0.0081	AMLEDIAILTGGQLISEELGMK	36.0232	287	308	47.2	6.3e-7
595.2812	2	+0.035	LENANLAM(Oxidation)LGK	15.5306	309	319	34.9	4.2e-6
665.3198	3	0.0022	EDTTIVEGM(Oxidation)GEKEALEAR	14.4267	328	345	19.8	0.0080
763.8327	2	0.0044	Q(Gln->pyro-Glu)IEDSSSDYDKEK	11.5751	352	364	18.1	0.0078
524.7479	2	+0.023	VGAATEIEMK	13.1456	381	390	35.2	3.5e-5
861.8609	2	+0.055	DAYTDMLEAGILDPAK	27.4021	485	500	31.1	3.8e-4

54. ábra. *A C. trachomatis EB-k és az NCR247 peptid kölcsönhatása.* ***A:*** *Az NCR247 kötődéséért felelős chlamydia ligand azonosítása Far Western blot analízissel. EB-ket és mock antigént szeparáltunk SDS-PAGE segítségével. A blotolást követően a membránt (2,4 oszlop) szintetikus NCR247-tel kezeltük, majd nyúl anti-NCR247 ellenanyaggal, aztán HRP-jelölt poliklonális anti-nyúl ellenanyaggal festettük. 1. oszlop: molekulasúly marker, 2. oszlop: mock preparátum, 3. oszlop chlamydia EB lizátum csak HRP-jelölt poliklonális anti-nyúl ellenanyaggal kezelve, 4. oszlop chlamydia EB lizátum szintetikus NCR 247-tel és nyúl anti-NCR247 ellenanyaggal, majd HRP-jelölt poliklonális anti-nyúl ellenanyaggal kezelve.* ***B:*** *A C. trachomatis proteinek azonosítása LC-MSMS vizsgálattal. A fehérje azonosítására szolgáló peptid fragmensek a táblázatban találhatók*.

Annak ellenőrzésére, hogy a peptid nem csak a denaturált fehérjékhez tud kötődni, áramlási citometria analízist végeztünk. Az **55. ábrán** látható, hogy a chlamydia EB-k reagáltak a FITC-konjugált NCR247 peptiddel **(B)**. A kezeletlenül hagyott EB-k **(A)**, valamint a korábban anti-chlamydiás hatást nem mutató NCR035 peptiddel kezelt EB-k nem mutattak emelkedett fluoreszcenciát **(C)**.



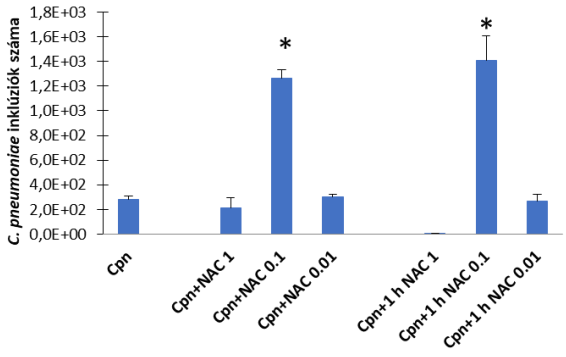
55. ábra: *A C. trachomatis és az NCR247 peptid közötti kapcsolat vizsgálata FACS analízissel.* ***A:*** *kezeletlen chlamydia EB-k,* ***B:*** *FITC-konjugált NCR247 peptiddel kezelt chlamydia EB-k,* ***C:*** *FITC-konjugált NCR035 peptiddel kezelt EB-k.*

Kísérleteinkben megvizsgáltuk *in vitro* 11 NCR peptid anti-chlamydiás hatását. Ezek közül 7 mutatott szignifikáns antimikrobiális hatást a *C. trachomatis* ellen 10 µg/ml koncentrációban alkalmazva. Az LC-MSMS tömegspektrometriás vizsgálat alapján a chlamydia EB-k NCR247 peptid kötődéséért felelős fehérjéje a GroEL protein. A GroEL protein (Hsp60) a chlamydiák azon proteinje, melynek bizonyítottan nagy szerepe van a chlamydiák pathogenezisében. Ez a

fehérje a dajkafehérjék (chaperon) I. csoportjába tartozik, csaknem az összes prokarióta és eukarióta sejt képes a termelésére, és a normális körülmények között keletkező, valamint a stressz hatására felszabaduló és a denaturált fehérjék megfelelő foldingjában játszik szerepet, mint intracelluláris segítő molekula [389]. Számos tanulmány beszámol arról, hogy a pathogén baktériumok által termelt dajkafehérjék működhetnek intracellulárisan, a sejt felszínén vagy extracelluláris szignálként a fertőzés során [390]. A chlamydia GroEL ellenes immunválasz korrelált a humán megbetegedések súlyosságával, és a *C. trachomatis* fertőzött betegek 80-90%-a hordoz GroEL specifikus ellenanyagot [399]. A betegekben levő magas fokú GroEL antigenitás azt jelenti, hogy ez a protein elérhető az immunrendszer számára, talán, mert jelen van az EB-k felszínén is. A korai tanulmányok, melyek a *C. trachomatis* és *a C. psittaci* EB-k membrán komplexének azonosításával foglalkoztak, rámutattak, hogy a GroEL protein a chlamydia membránban is jelen lehet [392]. Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy bizonyos NCR peptidek jelentős *in vitro* aktivitást mutatnak a *C. trachomatis* ellen. A jövőben egér modell beállítása szükséges annak vizsgálatára, hogy az *in vitro* vizsgálatokban talált antimikrobiális hatás mennyire paralel az *in vivo* megfigyelésekkel. Pozitív esetben a jövőben az AMP-k hasznosak lehetnek, mint anti-chlamydiás szerek.

A NAC hatása a C. pneumoniae in vitro szaporodására

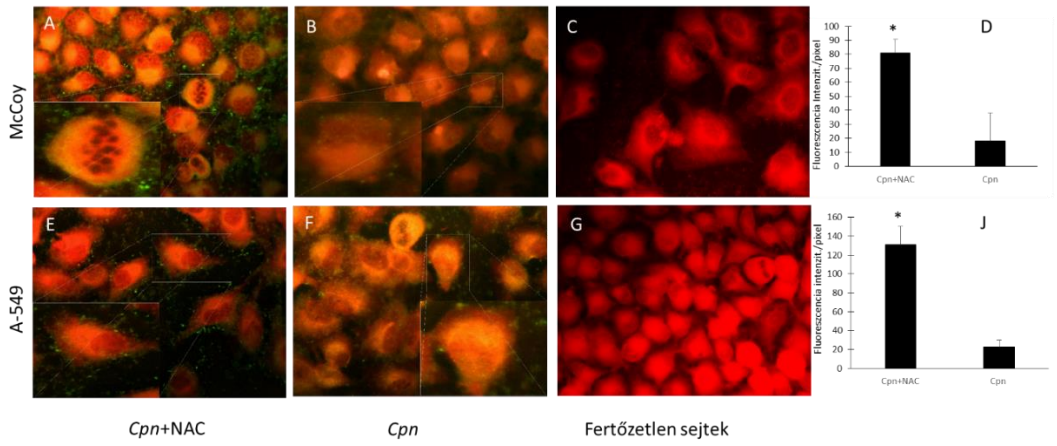
Az N-acetil-cisztein (NAC) Magyarországon a légúti fertőzések során a leggyakrabban használt nyákoldó. A NAC esetleges anti-chlamydiás hatását *in vitro* kívántuk tanulmányozni, mivel korábban ezt a területet, még nem vizsgálták. Ennek vizsgálatára a kísérleteink során különböző koncentrációban alkalmaztuk az NAC-ot kétféle megközelítésben. Először a NAC-ot csökkenő koncentrációban adtuk a *C. pneumoniae*hoz, és ezt követően a sejteket azonnal fertőztük. Az általunk használt 0.1 mg/ml NAC dózis körülbelül 6-szorosára növelte a visszatenyészthető chlamydia mennyiségét a nem kezelt, de fertőzött kontrollhoz képest. Ennek megfelelően a további kísérleteket ezzel a koncentrációval végeztük. A másik megközelítésben a NAC különböző koncentrációival kezelt chlamydiát egy órán át szobahőmérsékleten rázatva inkubáltuk és ezt követően raktuk fogékony sejtre, és a kétnapos inkubáció után vizsgáltuk a visszatenyészthető *C. pneumoniae* mennyiségét. Ahogy az az ábrán látható, nem volt különbség a *C. pneumoniae* infektivitásában a két különböző módon végrehajtott kísérletben **(56. ábra).**



56. ábra. *A különböző NAC koncentrációk és kezelési körülmények hatása a C. pneumoniae replikációra. A sejteket C. pneumoniaeval fertőztük és egy időben kezeltük különböző koncentrációjú (0.01–1 mg/ml) NAC-cal, vagy az EB-ket előinkubáltuk (1 óra (h)) különböző NAC koncentrációkkal és azután fertőztük a sejteket. A C. pneumoniae zárványok számát, IF festést követően UV-mikroszkóp segítségével határoztuk meg. Az oszlopok 5 párhuzamos kultúra átlagát+szórást mutatnak; * P<0.05.*

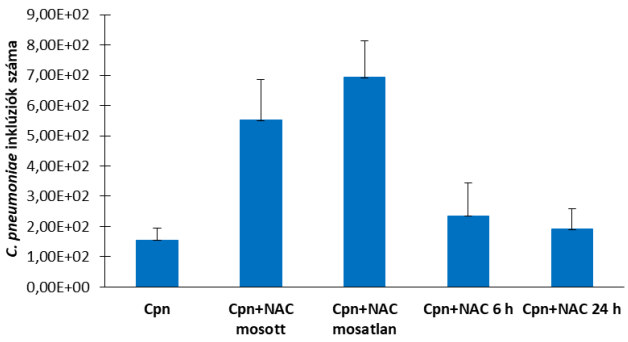
A NAC fokozza a C. pneumoniae kötődését a gazdasejthez

Annak tanulmányozására, hogy mennyire befolyásolja a NAC a *C. pneumoniae* kötődését a sejtekhez a McCoy szövetkultúra mellett egy relevánsabb, légúti eredetű epithel sejtet, az A549 sejtet is megfertőztünk NAC kezelt **(57A,E ábra)** és nem kezelt **(57B,F ábra)** *C. pneumoniae*val. Az eredmények alapján a NAC kezelt mintákban, mindkét sejttípusban fokozott intenzitású fluoreszcenciát tapasztaltunk összehasonlítva a csak *C. pneumoniae*val fertőzött mintákkal **(57D,J ábra)**. A kontroll sejtek nem mutattak immunfluoreszcenciát **(57C,G ábra)**.



57. ábra. *A NAC kezelés hatása a C. pneumoniae kötődésére. A McCoy vagy A549 sejteket NAC kezelt (0.1 mg/ml) és nem kezelt (A, E) C. pneumoniaeval fertőztük (Cpn) (B, F). Fertőzetlen sejtek (C, G). Az inkubációs periódust követően a sejteket festettük. A fluoreszcenciát UV-mikroszkóppal detektáltuk, és a C. pneumoniae fertőzött és kezelt valamint a fertőzött, de nem kezelt sejtek által mutatott fluoreszcenciát kvantitatív módon elemeztük (D, J) az ImageQuantTL 8.1 szoftver segítségével, *P <0.05.*

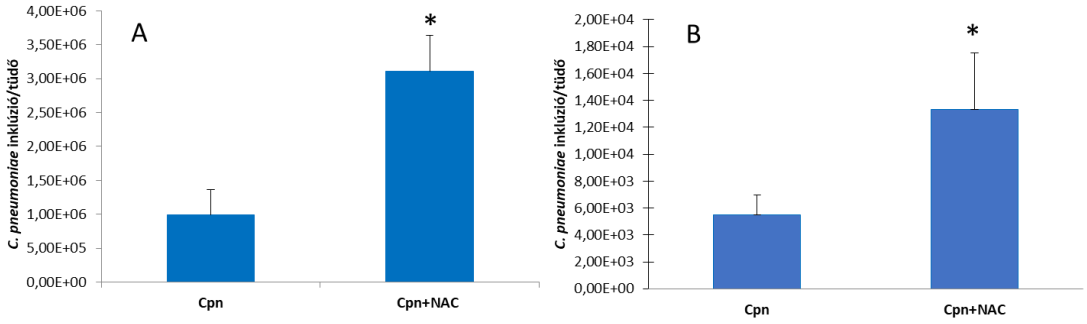
További kísérleteinkben azt tapasztaltuk, hogy a chlamydia 1 órás NAC kezelése után a NAC mosással való eltávolítása nem befolyásolta a visszatenyészthető *C. pneumoniae* mennyiségét a nem mosott chlamydiával összehasonlítva. Szintén nem láttunk változást a chlamydiák számában, ha a NAC-ot 6 illetve 24 órával a fertőzés után adtuk a *C. pneumoniae*val fertőzött szövetkultúrához **(58. ábra)**., ezen kívül akkor sem láttunk változást a chlamydiák számában, ha a sejteket 48 órával előkezeltük NAC-cal (nem szerepel az ábrán).



58. ábra. *A fertőzés előtti vagy utáni NAC kezelés hatása a C. pneumoniae szaporodására. Vizsgálati körülmények: kezeletlen C. pneumoniae (Cpn); NAC-cal előinkubált majd mosott EB-k (Cpn+NAC mosott); NAC-cal előkezelt, mosatlan EB-k (Cpn+NAC mosatlan); C. pneumoniaeval fertőzött sejtek, a fertőzést követően 6 illetve 24 órával NAC-cal kezelve. Az oszlopok 5 párhuzamos kultúra mennyiségének az átlagát+SD-t jelölik.*

A NAC kezelés fokozza a chlamydiák szaporodását és elnyújtja a fertőzés kimenetelét egerekben

Egerek egy csoportját a *C. pneumoniae* fertőzést követően a humán dózisnak megfelelő NAC-cal kezeltük *per os* hat napon keresztül, a fertőzött egerek másik részét nem részesítettük mukolitikus kezelésben. Az állatokat a fertőzést követő hetedik napon feláldoztuk és a tüdejüket eldörzsöltük és a visszatenyészthető chlamydia mennyiség meghatározására szövetkultúrára oltottuk. Az eredményeink alapján a NAC fokozta a gyulladás súlyosságát, a NAC kezelt egerekből háromszor több chlamydiát tudtunk visszatenyészteni a csak fertőzött egerekhez képest **(59A ábra)**. Ezt követően kíváncsiak voltunk arra, hogy a NAC miként befolyásolja a *C. pneumoniae* eliminálásának ütemét a szervezetből. Ennek kiderítésére az egerek egy másik csoportját fertőztük és kezeltük, illetve kezelés nélkül hagytuk. A fertőzést követő 20. napon az egereket feláldoztuk és a tüdejükből chlamydia visszatenyésztést végeztünk. A NAC kezelt csoportban az összes egér tüdejéből kitenyészthető volt a pathogén és a chlamydia mennyisége 2.5-szer nagyobb volt a nem kezelt egerekkel összehasonlítva, ráadásul a nem kezelt csoport 3 egerében már nem tudtunk kimutatni chlamydiát tenyésztéssel **(59B ábra)**.

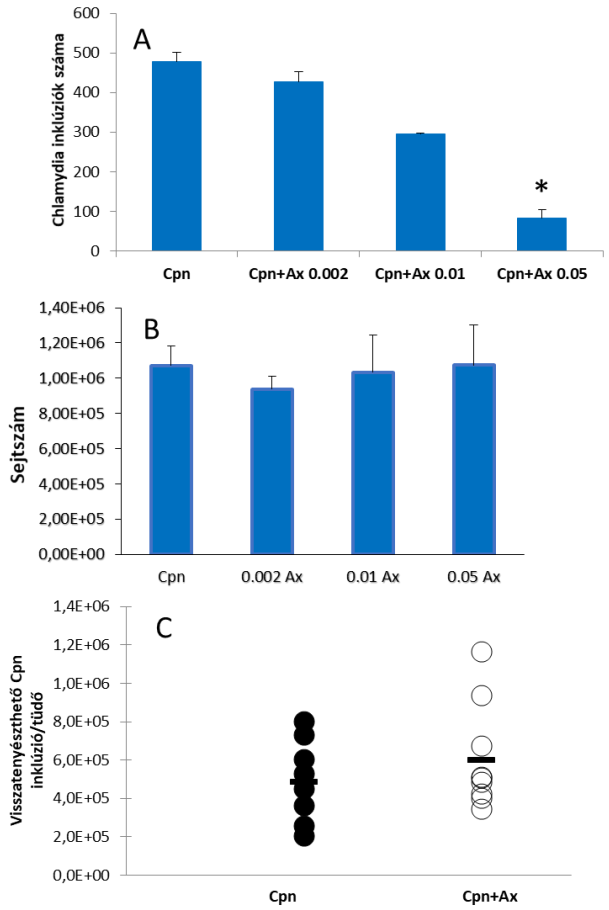


59. ábra. *A visszatenyészthető C. pneumoniae mennyisége NAC kezelt és kezeletlen egerek tüdejéből. Az NAC kezelt és nem kezelt egereket a 7. (A) és 20. (B) napon feláldoztuk és a tüdőhomogenizátumból meghatároztuk IF módszerrel az életképes C. pneumoniae mennyiségét. Az oszlopok az egyes egerekből visszatenyészthető chlamydiák átlagát+SD-t mutatják;* P<0.05.*

Az Ax nem fokozza a visszatenyészthető C. pneumoniae mennyiségét

A NAC-nál megfelelőbb alternatívát keresve, a mukolitikus hatású Ax-szel végeztünk a korábbiakhoz hasonló kísérleteket. *In vitro* rendszerben az Ax különböző koncentrációja jelenlétében fertőzve nem tapasztaltuk a chlamydia replikációt fokozó hatását, sőt a 0.05 mg/ml koncentráció szignifikáns antimikrobiális hatást mutatott **(60A ábra)**. Az alkalmazott Ax koncentrációk nem befolyásolták a sejtek szaporodó képességét **(60B ábra).** Ezt követően megpróbáltuk kideríteni az Ax antimikrobiális hatásának az okát. A NAC kísérlethez hasonlóan az Ax kezelt és nem kezelt EB-ket inokuláltuk McCoy és A549 szövetkultúrára. Ez esetben nem tapasztaltunk fluoreszcencia növekedést, tehát az Ax nem befolyásolta a chlamydia kötődését a gazdasejthez. Az irodalomban jól ismert, hogy a chlamydia fertőzések az antimikrobiális hatású IDO termelését fokozzák [393]. Annak kiderítésére, hogy az Ax befolyásolja-e az IDO expresszióját, a kezelt és nem kezelt *C. pneumoniae*val fertőzött sejtekből teljes RNS kivonást,

majd IDO specifikus qPCR vizsgálatot végeztünk. Az eredményeink alapján az Ax 2.5 szeresére fokozta az IDO expressziót. Ezt követően egereket fertőztünk, és egy csoportjukat a humán dózisnak megfelelő Ax-szel kezeltük naponta *per os*. A kontroll állatok az itatás okozta stressz mimikálására hasonló módon pipettából 50 µl vizet kaptak. Az egereket a hetedik napon feláldoztuk, a tüdejükből chlamydia visszatenyésztést végeztünk. A visszatenyészthető *C. pneumoniae* mennyisége nem különbözött a két csoportban **(60C ábra)**.



60. ábra. *Az Ax kezelés hatása in vitro és in vivo C. pneumoniae fertőzés során.* ***(A)*** *A McCoy sejteket C. pneumoniaeval fertőztük és ezzel egyidejűleg különböző mennyiségű Ax-szel (0.002–0.05 mg/ml) kezeltük. A C. pneumoniae zárványokat IF festéssel detektáltuk. Az adatok öt párhuzamos tenyészet átlagát±SD-t jelzik.* ***(B)*** *Az Ax különböző koncentrációinak hatása a sejtekre. Tripánkék festét követően az életképes sejteket öt párhuzamos kultúrában mikroszkóp alatt számoltuk.* ***(C)*** *C. pneumoniaeval fertőzött egerek egy csoportját Ax-szel (1.25 mg/kg) kezeltük. Az egereket a fertőzés után 7 nappal feláldoztuk, és a fertőző C. pneumoniae számát a homogenizált tüdőből IF festés segítségével határoztuk meg. A szimbólumok ●: C. pneumoniae fertőzött; ○: C. pneumoniae fertőzött+Ax kezelt individuális egereket jelölik.*

A NAC egy igen széles körben, leginkább mukolitikumként használt gyógyszer, mely vény nélkül beszerezhető, és az ára is kedvező. Korábban kimutatták, hogy fokozza a szervezet fő antioxidánsának a GSH-nak a mennyiségét emelve a glutathion-S-transzferáz aktivitást [175]. A NAC terápiás opció krónikus obstruktív pulmonális betegségekben, egy 1392 beteget magába foglaló tanulmány szerint csökkentette a sputum viszkozitását, a köhögés intenzitását, és könnyítette a levált nyák felköhögését két hónapos terápia során [394]. Ezen felül a NAC nagymértékben csökkentette az influenza tüneteit a placebot kapó kontrollcsoporttal összevetve [395]. A NAC direkt antimikrobiális szerepe nem teljesen definiált, de adatok elérhetőek arról, hogy képes gátolni a biofilm kialakulását. A NAC direkt antimikrobiális hatást mutatott különböző extracelluláris baktériumokkal szemben, bár az alkalmazott koncentrációk meglehetősen különböztek (0.003-80 mg/ml) [396][397]. Tuberculosis esetén úgy találták, hogy a NAC gátolja a *M. tuberculosis* intracelluláris

szaporodását [398]. Ezzel ellentétben csoportunk azt találta, hogy a NAC ahelyett, hogy csökkentené, fokozta a *C. pneumoniae* szaporodását *in vitro* és *in vivo* egyaránt. *In vitro* vizsgálatainkban kimutattuk azt, hogy a NAC fokozta a pathogén kapcsolódását a gazdasejthez **(57 ábra).** Lazarev és munkatársai vizsgálták az intracelluláris GSH szerepét *C. trachomatis* fertőzés során és azt találták, hogy a buthionine sulfoximine (mely a GSH bioszintézisének irreverzibilis gátlását vagy a GSH hidrogén-peroxid indukálta oxidációját okozza) csökkentette a *C. trachomatis* inklúziók számát. A kutatók az eredményeikből arra a következtetésre jutottak, hogy a GSH fontos szerepet játszik a chlamydiák szaporodásában [399]. Fontos megemlíteni, hogy a kísérleteik során az NAC-ot mint GSH prekurzor alkalmazták és nem vizsgálták a NAC direkt anti-chlamydiás hatását. Az ismert tény, hogy a chlamydiák infektivitása a sejtmembránban található OmcB redukált státuszától függ [400]. A kísérleteink eredményei egybevágtak hipotézisünkkel, vagyis a chlamydia EB-k NAC kezelése fokozta a pathogén sejthez kapcsolódását, valószínűleg az OmcB redukálásával és ez nem függhetett össze az emelkedett GSH-val, mivel a NAC-ot eltávolítottuk a rendszerből a kísérleteinkben alkalmazott mosási lépések során. Ennek megfelelően érdemes lenne más redukáló szereket, pl. az aszkorbinsavat megvizsgálni, hogy miként befolyásolják a *C. pneumoniae* kötődését a gazdasejthez. A NAC kedvezőtlen, a *C. pneumoniae* replikációt fokozó képességén túl számolnunk kell esetlegesen más, a *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, így 70-90%-ban, az általa okozott fertőzés tünetmentes. Ez azt vonja maga után, hogy az infekció általában nem kerül felfedezésre. A krónikus fertőzés legsúlyosabb szövődménye a méhen kívüli terhesség, a terméketlenség vagy a krónikus kismedencei gyulladás [401]. A legrosszabb esetben a felső légúti fertőzés kezelésére rendelt és szedett NAC fokozhatja nemcsak a *C. pneumoniae*, hanem a fennálló, de nem diagnosztizált *C. trachomatis* szaporodását is. Németországban a NAC a második leggyakrabban használt mukolitikum (az összes vénymentesen kiváltható expectoráns 23.5%-a) akut köhögésben [402]. A *C. pneumoniae* egy meglehetősen gyakori légúti pathogén, de sajnos ritkán diagnosztizálják korrekt módon. Ennek megfelelően, ha az orvos NAC-ot rendel nyákoldóként a beteg számára, késleltetheti betege felépülését. A *C. pneumoniae*ra vonatkozó prevalencia adatok ismeretében sok beteg szenvedhet hosszabb ideig fertőzésben a NAC kezelés következtében.

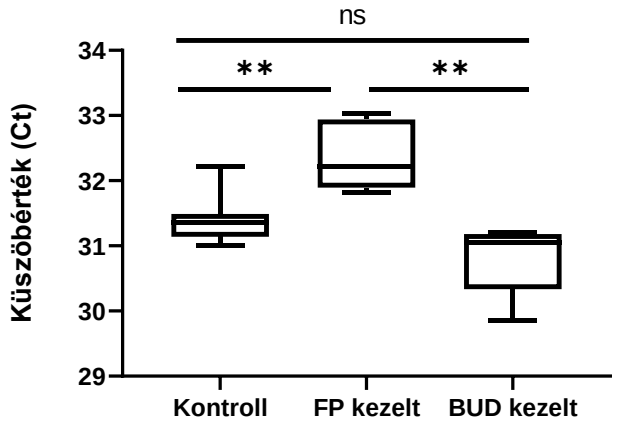
Annak érdekében, hogy elkerüljük a NAC a *C. pneumoniae*ra gyakorolt replikációt fokozó hatását egy másik mukolitikumot az Ax-et vettük górcső alá. Az Ax szignifikáns anti-chlamydiás hatást mutatott *in vitro*, viszont nem befolyásolta a baktériumok sejthez való kötődését. Az Ax komplett antimikrobiális hatását 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. Más kutatók pl. Yang és munkatársai azt tapasztalták, hogyha az Ax-et 10 mg/kg/nap dózisban alkalmazták, ami a normál humán dózis 8-szorosa, szignifikánsan csökkentette a mortalitást a letális dózisú

H3N2 influenza vírussal fertőzött egerekben [403]. Az utóbbi időkben megjelent közleményünkben eredményeink alapján a humán dózis 4-szerese egerekben szignifikánsan csökkentette a *C. pneumoniae* mennyiségét. [404]

Összefoglalásként megállapítható, hogy a NAC fokozza és elnyújtja a *C. pneumoniae* fertőzést az egerekben. Ha ez igaz emberben is, ennek ismerete elgondolkodtató lehet az alapellátásban dolgozó orvosok számára, akik nem tisztázott etiológiájú légúti fertőzés esetén NAC használatát javasolják. *C. pneumoniae* fertőzés esetén a korrekt, laboratóriumi diagnózis alapvető elvárás, ugyanis ennek hiányában az esetlegesen javasolt NAC ronthatja a beteg felépülési esélyét. Klinikai vizsgálatok szükségesek az állatmodellben tapasztalt eredményeink igazolására.

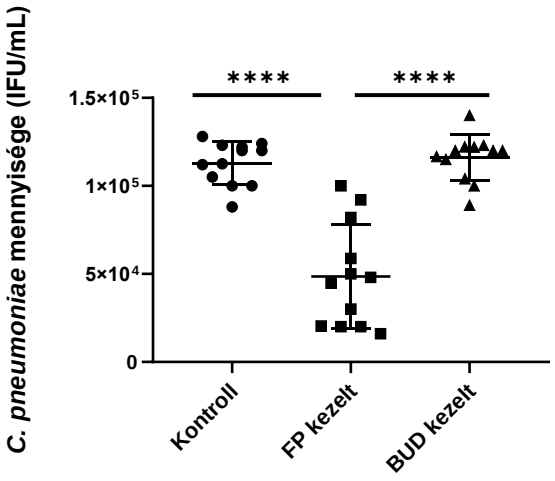
Inhalációs kortikoszteroidok, a flutikazon-propionát (FP) és a budezonid (BUD) hatásának vizsgálata a *C. pneumoniae* replikációjára légúti eredetű A549 sejtekben és *in vivo* egér modellben

Az inhalatív kortikoszteroidokat (ICS) gyakran használják az asthma kezelésében. Az asthmás epizódok fellángolásában szerepük lehet a különböző virális, bakteriális kórokozóknak, közöttük a *C. pneumoniae*nak is. Korábban még nem vizsgálták az ICS-ek *C. pneumoniae* szaporodására gyakorolt hatását. Kísérletünk során a *C. pneumoniae* szaporodását fertőzött, kezelt és kontroll A549 sejtekben direkt qPCR-rel mértük, mely során meghatároztuk az egyes küszöbértékeket (Ct). Az FP kezelést követően szignifikánsan magasabb Ct értékeket kaptunk, összehasonlítva a BUD-dal kezelt (32.35±0.51 vs. 30.81±0.55, P<0.01) illetve a nem kezelt, kontroll sejtekével (32.35±0.51 vs. 31.41±0.39, P<0.01), mely csökkent *C. pneumoniae* szaporodásra utalt **(61. ábra)**.



61. ábra. *Az FP és a BUD hatása a C. pneumoniae szaporodására légúti eredetű A549 sejtekben. Az A549 sejteket 24 órával a fertőzés előtt előkezeltünk FP-vel vagy BUD-dal, majd C. pneumoniae*val *(MOI 0.01) fertőztük. Ezt követően 48 órával direkt qPCR-t végeztünk és meghatároztuk a küszöbértékeket (Ct). Mintánként 5 párhuzamossal dolgoztunk. **P<0.01, ns: nem szignifikáns különbség*

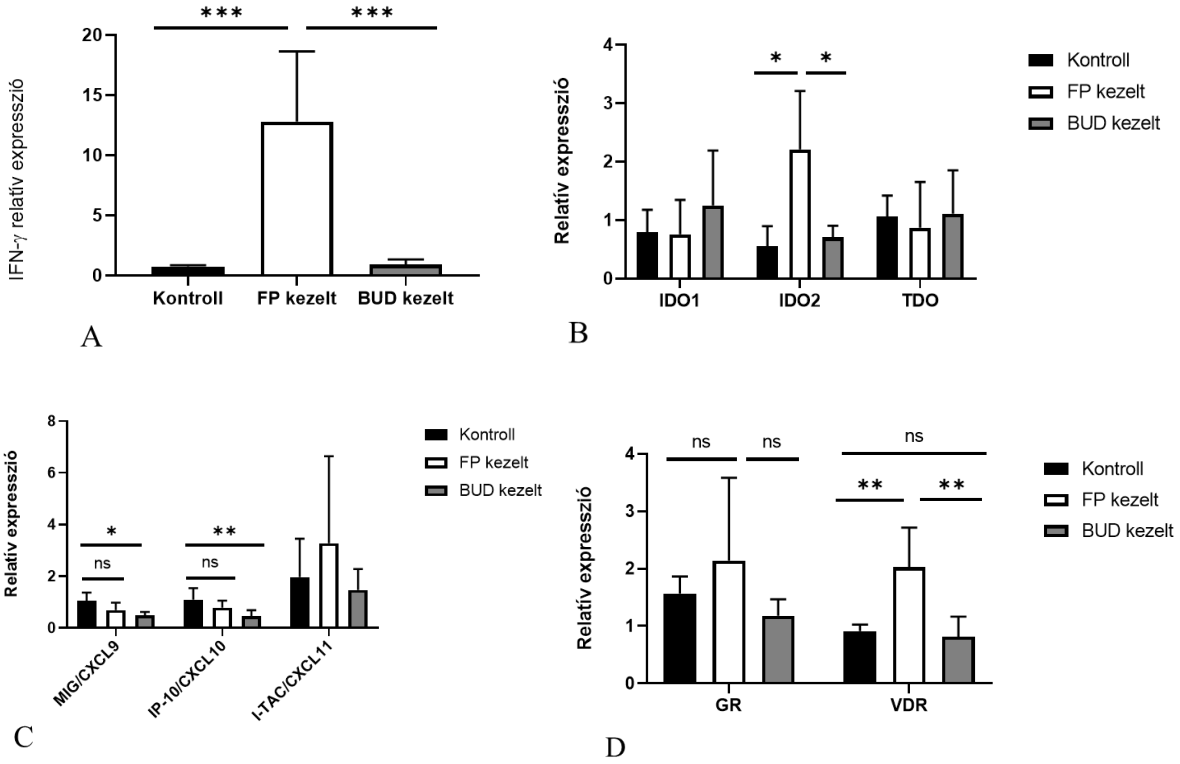
Az *in vitro* eredményeket *in vivo* kísérletben is igazolni kívántuk. Az egereket FP-vel vagy BUD-dal inhaláltattuk a fertőzést megelőzően 3 napig, majd a kezelést folytattuk még 7 napon keresztül. Az állatok tüdejéből a visszatenyészthető *C. pneumoniae* mennyiségét indirekt IF módszerrel határoztuk meg. Kísérleteink alapján az FP kezelt, fertőzött egerek tüdejéből szignifikánsan kevesebb *C. pneumoniae*t detektáltunk, összehasonlítva a BUD-dal kezelt és a kontroll csoporttal (P<0.0001) **(62. ábra)**.



62. ábra. *Az FP és a BUD hatása a C. pneumoniae szaporodására egerek tüdejében. A homogenizált tüdők (csoportonként 12) felülúszóiból C. pneumoniae visszatenyésztést végeztünk McCoy sejten majd a C. pneumoniae mennyiségét indirekt IF módszerrel határoztuk meg. A szimbólumok az egyes egerekből visszatenyésztett chlamydia mennyiségét mutatják, a vízszintes vonalak az átlag ±SD-t ábrázolják. ****P<0.0001*

A FP és BUD kezelés hatása az IFN-γ és általa indukált gének illetve a kortikoszteroid válaszban szerepet játszó gének relatív expressziójára *C. pneumoniae* fertőzött egér tüdőkben

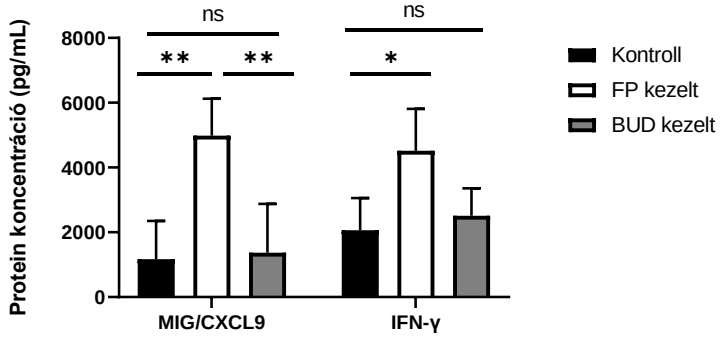
Kísérletünk során kimutattuk, hogy az IFN-γ relatív expressziója szignifikánsan megnőtt az FP-vel kezelt egerekben (*P*<0.001) a BUD-dal kezelt és a kontroll egerekhez képest **(63A ábra)**. Eredményeink szignifikánsan fokozott IDO2 expressziót mutattak az FP-vel kezelt egerekben, a kontroll és a BUD-kezelt csoporthoz hasonlítva (*P*<0.05) **(63B ábra)**. Továbbá azt tapasztaltuk, hogy a BUD szignifikánsan csökkentette a MIG/CXCL9 (*P*<0.05) és az IP-10/CXCL10 (*P*<0.01) expresszióját a kezeletlen, *C. pneumoniae* fertőzött kontroll egerekhez képest **(63C ábra)**. Eredményeink alapján a FP kezelés szignifikánsan növelte a VDR (D-vitamin receptor) expressziót összehasonlítva a kontroll és a BUD kezelt egerekkel (*P*<0.01), míg a BUD kezelés nem befolyásolta azt **(63D ábra)**.



63. ábra. *Az FP és a BUD kezelés hatása a C. pneumoniae fertőzött egerek tüdejében. Az egereket a fertőzést követő 7. napon feláldoztuk, az eldörzsölt tüdőkből RNS-t vontunk ki. Az IFN-γ (A), IDO1, IDO2, TDO (B), és IFN-γ-indukált chemokinek (C), illetve VDR és GR (D) gének relatív expresszióját qPCR módszerrel határoztuk meg. A relatív expresszió értékét a β-aktin génre normalizálva adtuk meg. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ns: nem szignifikáns különbség*

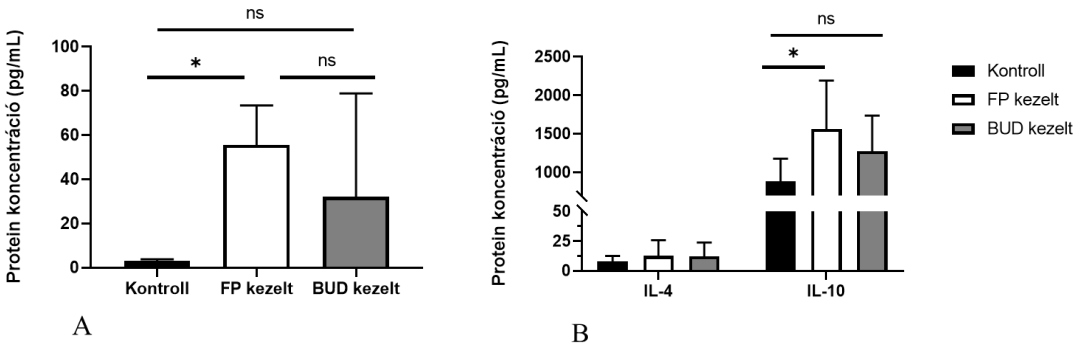
Az FP és a BUD hatása a *C. pneumoniae* fertőzésben szerepet játszó gyulladásos proteinek termelődésére

Eredményeink alapján az IFN-γ termelése szignifikánsan emelkedett volt FP kezelést követően, összehasonlítva a nem kezelt, kontroll egerekkel (P<0.05). Az FP kezelt egerek tüdejében szignifikánsan emelkedett MIG/CXCL-9 fehérje szinteket mértünk, összevetve a nem kezelt, kontroll illetve a BUD-dal kezelt egerekkel (P<0.01) **(64. ábra)**.



64. ábra. *Az IFN-γ és a MIG/CXCL-9 protein mennyisége fertőzött, FP vagy BUD kezelt egerekben. A protein szinteket az egér tüdők homogenizátumokból a fertőzést követő 7. napon ELISA módszerrel határoztuk meg. *P<0.05, ** P<0.01, ns: nem szignifikáns különbség*

A FP-vel kezelt egerek tüdejében szignifikánsan magasabb IL-17A szinteket mértünk a kontroll egerekéhez képest (P<0.05). Az FP és a BUD kezelés nem változtatta meg az IL-4 termelését jelentős mértékben, azonban, az IL-10 mennyisége szignifikánsan több volt a FP-vel kezelt egerek tüdejében, összehasonlítva a BUD-dal kezelt illetve a kontroll egerekkel (P<0.05) **(65. ábra)**.



65. ábra. *Az FP és a BUD hatása a C. pneumiae fertőzésben szerepet játszó gyulladásos proteinek termelődésére. Az IL-17A (A), IL-4 és IL-10 (B) mennyiségét a homogenizált tüdők felülúszójából ELISA módszerrel határoztuk meg. Az eredményeket minden csoportban (n=12) átlag ±SD. *P<0.05, ns: nem szignifikáns különbség*

Az ICS-ekkel végzett kísérleti eredményeink számos új eredményt tártak fel, amelyek gyakorlati jelentőséggel bírhatnak a gyakorló orvosok számára is. Az *in vitro* eredményeink alapján a 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. Mivel az IFN-γ anti-chlamydiás hatással bír, további munkánk során az IFN-γ és az IFN-γ indukált mechanizmusokat vizsgáltuk. Az IFN-γ fokozza az IDO aktivitást, melynek következményeként csökken a triptofán mennyisége. Mivel a chlamydiák triptofán-auxotrófok, a fokozott IDO aktivitás gátolja a chlamydiák szaporodását mind *in vitro* és *in vivo* [62] [405]. Ezen kívül az IFN-γ fokozza a veleszületett immunitásban szerepet játszó gének expresszióját, így tovább hozzájárulva a chlamydia fertőzéseket gátló mechanizmusok beindulásához [316]. Eredményeinkből kiderült, hogy az FP nemcsak a transzkripció szintjén, hanem a fehérje szinten is jelentősen indukálja az IFN-γ-t, ellentétben a BUD-dal, alátámasztva a korábban leírtakat, miszerint az FP nem csökkenti az IFN-γ-val kapcsolatos utakat [406]. Azt már korábban leírtuk, hogy az IFN-γ fokozza az antimikrobiális hatású MIG/CXCL9 termelődését *C. pneumoniae* [322] valamint *C. trachomatis* és *C. muridarum* fertőzés [316] esetén. Az FP kezelés során az IFN-γ-val párhuzamosan emelkedett a MIG/CXCL9 fehérje termelődése, összehasonlítva a kezeletlen kontroll és a BUD-dal kezelt egér tüdőkkel. Az FP nem változtatta meg az IFN-γ indukálható chemokinek expresszióját, ami arra utal, hogy más mechanizmusok is szerepet játszhatnak a chemokinek expressziójában. A BUD kezelés szignifikánsan csökkentette a CXCL-10 és a CXCL-11 génexpresszióját, ahogy azt már mások is korábban leírták [407], mely nem volt megfigyelhető FP esetén. Kísérleteink

alapján a fertőzés során a különböző ICS kezelések eltérő hatással voltak az IFN-γ válaszra és a chemokin termelésre, valamint a génexpresszióra is.

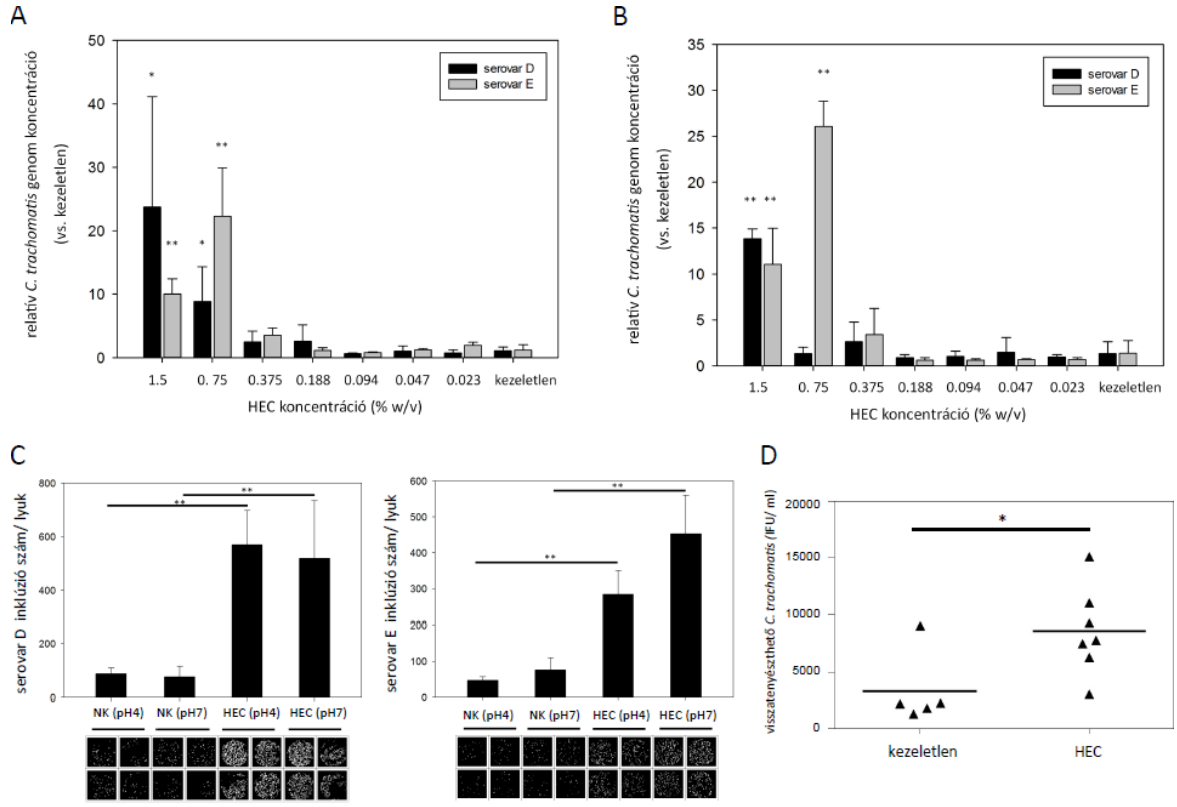
Az IDO aktivitás a triptofán kimerüléséhez és így a chlamydia szaporodásának gátlásához vezethet sejttenyészetekben és egerekben. Ezenkívül az IDO aktivitása számos tüdőbetegséghez kapcsolódik, beleértve a tüdőrákot is [408]. ICS-ben részesülő asthmás betegeknél a köpet IDO aktivitása IL-10-függő módon fokozódott; az ICS-ek az IDO aktivitással párhuzamosan fokozták a macrophágok IL-10 szekrécióját, jelezve, hogy az ICS használat IDO aktivitást generálhat IL-10 termelés révén [409]. Eredményeink az IL-10 termelés jelentős növekedését is jelzik az FP beadása után fertőzött egerekben; ezzel ellentétben, a BUD-nak nem volt ilyen hatása. Mivel köztudott, hogy az FP *in vivo* növelheti az IL-10 helyi szekrécióját [410], arra a következtetésre jutottunk, hogy a megfigyelt IDO aktivitás származhatott az IFN-γ és akár az IL-10 hatásából is. 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 is hozzájárulhat a *C. pneumoniae* gátlásához, amint azt egy korábbi tanulmány is közölte, az IL-17A szinergizálhat az IFN-γ-val és így szerepet játszhat a chlamydia fertőzés eliminálásában [411].

Végül elemeztük a GR és a VDR proteinek kódolásáért felelős gének relatív expresszióját, és azt találtuk, hogy az FP kezelés szignifikánsan növelte a *VDR* expressziót a kontroll és a BUD kezelt egerekhez képest. A *VDR* a chlamydia fertőzött egérsejtek egyik erősen alulszabályozott transzkripciós faktora [316], ami arra utal, hogy a kísérletünkben 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 [412]. A D-vitamin szerepet játszik a bakteriális fertőzések visszaszorításában, és számos hatása van az adaptív és veleszületett immunitás modulálásával a bakteriális fertőzések eradikálásában [413]. Ezért eredményeink felvetik annak lehetőségét, hogy az FP támogatja a VDR funkciókat, amelyek aztán tovább befolyásolhatják a cytokin és chemokin termelést. Kísérleteink alapján fontos lenne az ICS használat és a VDR aktivitás közötti kölcsönhatás további vizsgálata, mivel a D-vitamin kiegészítése széles körben ajánlott asthmában.

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

A HEC egy általánosan használt gélesítő szer, amely megtalálható fő komponensként a síkosító anyagokban és a terápiás gélekben egyaránt [414][180]. 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-k 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 **66. ábra** a chlamydia szaporodás HEC-koncentrációtól függő fokozódását mutatja. A *C. trachomatis* D szaporodásának

maximális növekedése 23.7-szeres volt a maximális 1.5 tömeg/térfogat% HEC koncentrációnál. Érzékelhető, de nem szignifikáns replikációt fokozó tendencia jelentkezett 0.188 tömeg/térfogat% HEC koncentrációig (pH 4.2) **(66A ábra).** A HEC pH 7-nél jelentősen fokozta a chlamydia szaporodását, 13.8-szoros növekedéssel 1.5 tömeg/térfogat% koncentráció mellett **(66B ábra)**. 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 **(66A,B ábra).** A qPCR eredmények validálása céljából ChlamyCount módszerrel elvégeztük a chlamydia inklúzió számlálást pH=4.2 vagy 7 értéken 1.5 tömeg/térfogat% és 0.75 tömeg/térfogat% HEC koncentrációknál a vizsgált két szerovariáns esetében. Az inklúzió számok hasonló, bár kevésbé intenzív növekedés fokozódását mutattak, mint a qPCR módszerrel végzett chlamydia genom mérések, a D szerovariáns esetében 5.9-6.5-szörös, az E szerovariánsnál pedig 5.95-6.05-szörös növekedés volt észlelhető **(66C ábra).** Ez a különbség valószínűleg annak köszönhető, hogy a ChlamyCount a chlamydia inklúziók számát, míg a qPCR az inklúziók bakteriális genom tartalmát méri. Az egérkísérletekből 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 **(66D ábra).**



66. ábra *A HEC hatása a C. trachomatis D és E szaporodására in vitro és egér modellben. A HEC hatása a C. trachomatis D és E szaporodására HeLa229 sejtkultúrában pH 4.2 (A) és pH 7.0 (B) esetén. A qPCR-rel meghatározott genom mennyiség validálása automata ChlamyCount módszerrel (C). HEC-cel kezelt és nem kezelt egerek cervicovaginális mintájából visszatenyészthető C. trachomatis D mennyisége. Az adatok átlagok±SD, *P < 0.05; **P < 0.01*.

A HEC *C. trachomatis* szaporodására gyakorolt hatását vizsgáló kísérleteink eredményei különböznek Sater és mtsai. eredményeitől, akik a *C. trachomatis* L2 lymphogranuloma venereum törzset alkalmazták kísérletük során, és abban a HEC koncentrációtól és pH-tól függő gátló hatását mutatták ki a chlamydia *in vitro* növekedésére [415]. A két vizsgálat között azonban fontos különbségek vannak, az egyik, hogy csoportunk olyan komplex puffert használt, amely jobban utánozza a vaginális váladék fizikai-kémiai tulajdonságait. A másik, hogy az általunk megfigyelt növekedés fokozó hatás 0.75–1.5 tömeg/térfogat% (7500–15 000 µg/ml) HEC koncentrációknál nyilvánult meg, amelyek a hüvely gélekben gyakoriak [180], [416], míg Sater és csoportja szignifikánsan alacsonyabb HEC koncentrációkat használt (2–200 µg/ml), valamint az L2 szerotípus (mely az LGV kórokozója) helyett csoportunk a jóval gyakoribb D és E urogenitális szerotípusokat használta a kísérletek során. Míg a *C. trachomatis* D és L2 között a genetikai különbségek kisebbek [417], a fenotípusos különbségek a két szerotípus között nagyok. A mások által vezetett vizsgálatok azt mutatták, hogy korai kölcsönhatásuk az epitheliális sejtekkel eltérőek [418], pl. a gazda hámsejtek centrifugálása és dextrán előkezelése növeli az urogenitális *C. trachomatis* szerotípusok fertőzési hatékonyságát, de nincs hatással az L2 szerotípusra. Ezen túlmenően az E szerotípus fertőzés a heparintól független, míg az L2 szerotípus fertőzés erősen függ a heparintól [419]. Mivel a HEC valószínűleg befolyásolja a korai interakciókat az EB-k és a gazdasejtek között, ez a hatás eltérhet a LGV és az urogenitális szerovariánsok között.

Összefoglalás

Munkánk eredményeként az alábbi új megállapításokat tettük ebben a témában:

1. Kimutattuk, hogy az általunk vizsgált 11 NCR peptid közül 7 anti-chlamydiás hatással rendelkezik.
2. Azonosítottuk a GroEL fehérjét, mint az anti-chlamydiás hatással bíró NCR247 peptid kötéséért felelős ligandot.
3. Kísérletileg igazoltuk, hogy a mukolitikumként gyakran használt NAC *in vitro* és *in vivo* egerekben is fokozza a *C. pneumoniae* szaporodását.
4. Igazoltuk, hogy *in vitro* a NAC fokozza a *C. pneumoniae* kötődését a gazdasejthez és ezáltal elősegíti a szaporodását.
5. Bizonyítottuk, hogy az Ax *in vitro* csökkenti a *C. pneumoniae* szaporodását bizonyos koncentrációban, viszont a humán dózisnak megfelelő koncentrációban alkalmazva nem befolyásolja a *C. pneumoniae* szaporodását az egerek tüdejében.
6. 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 cytokinek termelődésével.
7. 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.

4.6. A CMV fertőzést kísérő celluláris és humorális immunválasz

A HCMV okozta congenitális károsodások valamint a primer illetve reaktiválódó vírusfertőzések megakadályozására szükség lenne egy az immunszupprimált emberek részére is adható vakcinára. A vírusfertőzések, így a CMV elleni küzdelemben kiemelkedő szerepet játszik a szervezet celluláris immunválasza. Kísérleteink során ennek vizsgálatára egészséges véradók CMV specifikus CTL aktivitását, valamint a különféle CMV antigént kifejező DNS vakcinára kialakult immunválaszt tanulmányoztuk egér modellben.

Ebben a témában az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

1. Milyen százalékban mutatnak HCMV IE1-exon4, pp65, pp150, gB és pp28 specifikus CTL 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-gBΔtm) gB-vel DNS-immunizált egerekben kialakult ellenanyagválaszra?
5. Befolyásolja-e az intramuscularis oltás módja az alkalmazott pVR-gBΔtm által kiváltott immunválaszt egérben?
6. Milyen hatással van a gB alegység (protein) emlékeztető (booster) oltás a gB szekretált formájával (pVR-gBΔtm) DNS-immunizált egerek antitest válaszára?
7. Indukálódik-e a pVR-pp65 plazmiddal DNS-immunizált egerekben CTL válasz; és az IFN-α hogyan befolyásolja a pp65-specifikus CTL és gB-specifikus antitest választ?

A CMV IE1-exon4, pp65, pp150, gB és pp28 specifikus CTL válasz egészséges véradókban

A kísérletbe bevont CMV szeronegatív donorok nem mutattak CTL aktivitást CMV 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 közül 2 egyén 3 antigénre (pp65, IE1-exon4, pp150), 9 egyén 2 antigénre, 6 pedig 1 antigénre mutatott CTL aktivitást a vizsgálatok során. Ezen utóbbi csoportból 2 csak IE1-exon4 antigénre reagált, és 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 prekurzor frekvenciájával. A prekurzor CTL-ek számának meghatározására hígításos módszert alkalmaztunk, melynek eredményeként az egyik donor esetében egy millió PBMC-re számítva az IE1-exon4 specifikus prekurzor CTL-ek száma $566/10^6$ PBMC, a pp65 esetében pedig $699/10^6$ PBMC volt. Más donorok esetében is hasonló eredményeket kaptunk. Annak vizsgálatára, hogy a stimulált effektor CTL-ek milyen MHC restrikció alá esnek a CTL-eket részlegesen HLA azonos (matched) és különböző HLA molekulát hordozó (mismatched) targetekkel hoztuk össze, melyek különböző HCMV antigéneket fejeztek ki. Kísérleteink során

a H-36-os donor magas pp65, IE1-exon4, és pp150 specifikus aktivitást mutatott. Esetében a pp65-specifikus ölés a HLA-A2 molekula jelenlététől függött, ugyanis csak azokat a target sejteket (részlegesen matched) tudta lizálni, melyek kifejezték a HLA-A2 molekulát. Hasonló eredményre jutottunk az IE1-exon4 antigén esetében is, vagyis a HLA-A2 molekulát hordozó target sejtek esetében kaptunk lízist. A pp150 specifikus lízis viszont az eredményeink alapján a HLA-A3 jelenlététől függött. További 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, anti-CD8 vagy mindkettő ellenanyagot használva) követő citotoxicitási vizsgálatok szerint a pp65 specifikus ölésben a $CD8^+$ fenotípusú, míg az IE1-exon4 specifikus lízisben mind a $CD4^+$, mind a $CD8^+$ CTL-ek részt vettek. A korábbi vizsgálatok alapján a HCMV domináns antigénje, melyek kiváltja a specifikus CTL-ek képződését, a pp65 [420] [421]. Az, hogy a CTL-ek felismerik az exogén úton bejutott pp65 antigént megerősíti, hogy a specifikus CTL-ek a vírussal fertőzött sejten is hatnak közvetlenül a fertőzés után, még mielőtt megindulna a vírus szaporodása, a virion összeépülése. A kísérletünkbe bevont 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. Korábban már leírták, hogy a HLA-B35, A2, B7, B8 és a B35 képes prezentálni [420], a saját eredményeink szerint részleges „mismatched” rendszert használva a következő HLA molekulák képesek a pp65 epitópok prezentálására: A1, A2, A28, A68, B7 és a B12/44. A pp65 mellett kísérleteink alapján az IE1-exon4 antigén is fontos CTL targetnek bizonyult. Az IE1 szerepe viszont 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.

Vizsgálatunk kimutatta, hogy (1) az IE1-exon4 fehérje csaknem ugyanolyan elterjedt CTL célpont, mint a pp65; (2) a gB és a pp150 specifikus CTL-ek a szeropozitív donorok körülbelül egyharmadában mutathatók ki; és (3) a pp28 nem immundomináns CTL célpont. 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. Az a tény, hogy a CMV szeropozitív dororok közül 2 csak IE1-exon4 specifikus CTL aktivitást mutatott, rávilágít arra, hogy esetükben a kizárólag pp65 subunit alapú vakcina nem indukálna megfelelő immunválaszt. Az általunk tanulmányozott CMV fehérjék (pp65, gB, IE-exon4) napjainkban különböző platformú vakcinákban szerepelnek különböző fázis 1-3 vizsgálatokban [182].

A bupivakain előkezelés hatása a teljes hosszúságú membránkötött (pVR-gB) és a szekretált (pVR-gBΔtm) gB-vel DNS immunizált egerekben kialakult ellenanyagválaszra

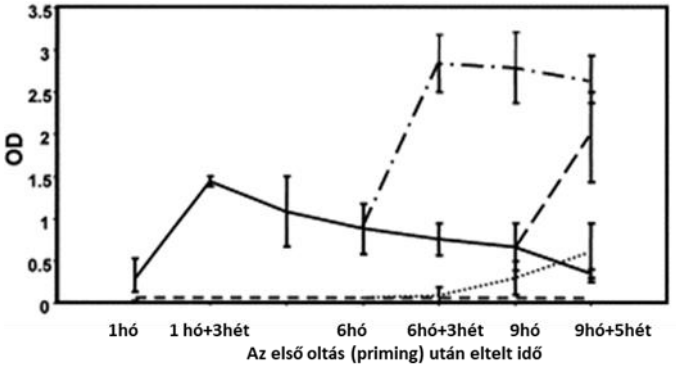
Korábbi vizsgálataink a CMV gB fehérje membránkötött vagy szekretált formájával, amelyeket a teljes hosszúságú vagy csonkolt gB gént tartalmazó pΔRC plazmidok expresszáltak, azt mutatták, hogy a csonka forma nagyobb ellenanyag választ indukál egerekben [422]. Jelen kísérletünkben 7–10 CBA egeret oltottuk bupivakainnal 100 μg/100 μl dózisban, három helyen a quadriceps izomba, majd 1 nappal később ugyan erre a helyre 50 μg VR-gB DNS-t oltottunk, amely teljes hosszúságú membránkötött gB-t vagy VR-gBΔtm DNS-t (amely a szekretált gB-t) fejezte ki. Négy héttel később a VR-gB vagy a VR-gBΔtm oltást megismételtük azonos dózist használva, de bupivakain előkezelés nélkül. A szérummintákat az első oltás után 2 és 3 hónappal vettük. 2 hónap elteltével a gB szekretált formája szignifikánsan magasabb ellenanyagszintet, OD-t indukált ELISA módszerrel mérve, mint a membránhoz kötött forma (átlag±SD: 1.43±0.68 vs. 0.28±0.27, P<0.001) valamint a neutralizáló ellenanyag válasz is magasabb volt. Érdekes módon nem volt korreláció a neutralizáló titerek és az OD között néhány szérumban, az eltérés oka lehet pl. az *in vivo* transzfektált sejtek által termelt gB tercier struktúrájának egyedi különbségei vagy az eltérő ellenanyag érés is. Hasonló eltéréseket mutattak a neutralizáló és az ELISA titerek a mások által elvégzett vizsgálatokban is [423]. A bupivakain előkezelést különféle plazmid DNS konstrukciókkal, köztük a HIV-1 és hepatitis E-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 [424], [425]. Kísérleteinkben azonban a bupivakain előkezelés nem növelte a válaszadó egerek számát, illetve az ELISA vagy neutralizáló ellenanyag titereket bármelyik gB formát alkalmazva sem. Sőt, a bupivakain előkezelés csökkentette az ELISA és a neutralizáló ellenanyagok titerét, amelyeket a gB szekretált formája indukált (pVR-gBΔtm). Nem világos, hogy a bupivakain előkezelés után miért csökkent a szekretált gB-re adott ellenanyagválasz, de az antigének immunogenitása eltérhet a helyi környezettől függően. Így minden további kísérletben bupivakain előkezelés nélkül használtuk a pVR-gBΔtm-t DNS immunizálásra.

Az intramusculárisan alkalmazott pVR-gBΔtm által kiváltott immunválasz egérben

Kísérleteink során CBA egereket oltottunk 50 μg pVR-gBΔtm-mel a quadriceps izomba, 1 vagy 3 helyre elosztva. Az oltást 3 hónappal később megismételtük ugyanezzel a dózissal és oltási módszerrel. Az ELISA-ban OD-vel mért ellenanyag válasz minden vizsgált időpontban (1., 3. hónap és 3. hónap+3. hét) magasabb volt azokban az egerekben, amelyeket a quadriceps három helyén oltottuk összehasonlítva az egy helyen oltott egerek eredményeivel (P <0.05, 1 hónappal az oltást követően). A több helyen végzett oltások növelik az antigén felvételének és annak a perifériás immunszervekbe juttatásának lehetőségét a monocyták és a rezidens csontvelői eredetű antigénbemutató sejtek által.

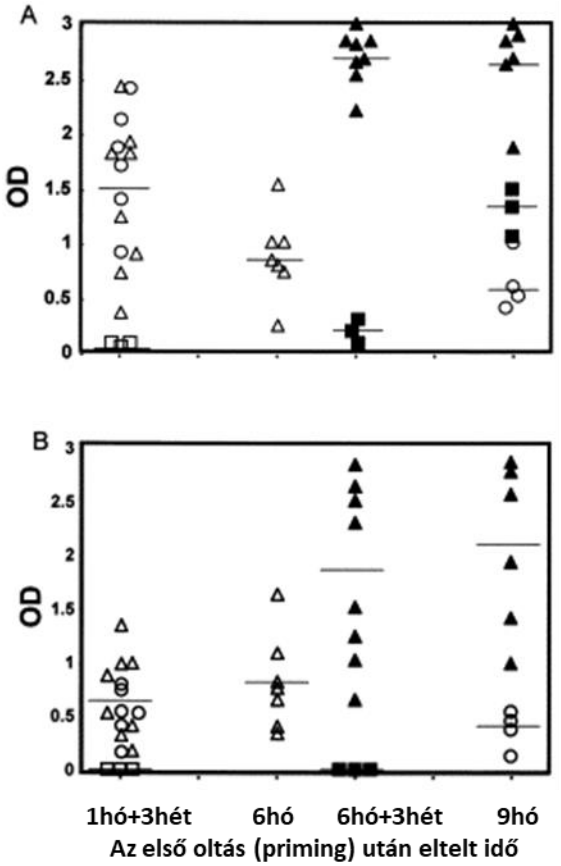
A gB alegység (protein) emlékeztető (booster) oltás hatása a gB szekretált formájával (pVR-gBΔtm) immunizált egerek antitest válaszára

A plazmid DNS-sel történt alapimmunizálást követően alkalmazott alegység protein, emlékeztető oltás magas titerű és tartós ellenanyagválaszt indukált különböző antigénekre, pl. a HIV I típusú envelop [426] és a *Plasmodium falciparum* antigén esetén is [427]. Az influenzavírus hemagglutinin-glikoproteinnel végzett DNS immunizálás azonban nem igényelte a fehérje booster (emlékeztető) oltást a magas titerű és tartós ellenanyagválasz eléréséhez, jelezve az antigének közötti, vagy a plazmid-DNS-ek által *in vivo* kifejezett fehérjekoncentrációk közötti különbségeket [428]. Annak meghatározására, hogy a gB alegységgel végzett emlékeztető oltás fokozhatja-e a pVR-gBΔtm-mel beoltott egerekben indukált ellenanyag mennyiségét, perzisztenciáját és neutralizáló aktivitását, és hogy az egerek genetikai háttere befolyásolja-e az ellenanyagválaszt az elsődleges oltást követően, BALB/c és CBA egeret oltottunk be 50 µg pVR-gBΔtm-mel a quadriceps izomba több helyre, két alkalommal, négyhetes intervallumokban, és a 6. vagy a 9. hónapban 1 µg alegység gB proteinnel boostereltük az állatokat. A kontroll egereket hasonlóan immunizáltuk nem releváns pVR-pp65-tel és a későbbiekben gB proteinnel boostereltük őket. A szérummintákat különböző időpontokban vettük. Amint az a **67. ábrán** látható, a pVR-gBΔtm-mel oltott BALB/c egerek szérumának átlagos OD értéke 1.45±0.58 volt a második oltás utáni 3. héten, ám ezek az értékek fokozatosan csökkentek (0.88±0.25 a 6. hónapra és 0.354±0.047 a 10 hónapra). Ugyanakkor azokban a BALB/c egerekben, amelyek a 6. hónapban kaptak gB booster oltást, szignifikánsan növekedett az ellenanyagszint (OD: 2.841±0.343) a szérumban, szemben az OD 0.756±0.186 (6. hó+3. hét) értékkel a boostert nem kapott egerekben *(P*<0.001*).* A 9. hónapban adott emlékeztető oltás után 5 héttel az OD 1.975±0.530 volt a szérumokban, szemben a nem boosterelt egerek OD 0.354±0.047 értékeivel *(P*<0.01). Az összes VR-gBΔtm-mel immunizált egér szérumában a vizsgált időpontokban kimutatható volt a gB specifikus ellenanyag termelés. Az immunizált, majd a 6. hónapban booster oltást kapott, és ezt követően 3 héttel megvizsgált egerekben a neutralizáló titer 1:146, míg a booster oltást nem kapott egerekben a titer 1:16 volt. Ezek az eredmények azt jelzik, hogy a pVR-gBΔtm szignifikáns antitestválaszt indukált, amely elérve a platót lassan csökken az idő múlásával, de az első oltás beadása után 6–9 hónappal alkalmazott gB alegység oltás a plato szint fölé képes emelni azt. A priming hatás gB specifitását az jelzi, hogy a pVR-pp65 DNS immunizált egerekben a gB specifikus ellenanyagtermelődés fokozásása nem ment végbe **(67. ábra)**.



67. ábra. *A gB protein booster hatása a pVR-gBΔtm által indukált IgG ellenanyagválaszra. Az egereket kétszer immunizáltuk pVR-gBΔtm plazmiddal (—) és 6 hónap (– · –) illetve 9 hónap (– –) múlva boostereltük gB proteinnel. A kontroll egereket pVR-pp65 plazmiddal DNS immunizáltuk és a 6. hónapban boostereltük gB proteinnel (·····). Az ábrán jelölt időpontokban szérumot nyertünk és az gB specifikus ellenanyagokat ELISA módszerrel mutattuk ki. Az adatok átlagot +2xSD-t jelölnek.*

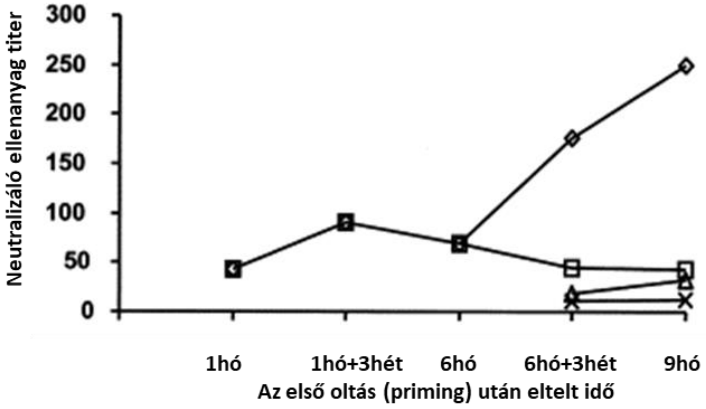
A BALB/c egerekből nyert szérumok IgG altípusainak ELISA vizsgálata során kiderült, hogy a szérumok IgG1-tartalma jóval magasabb volt, mint az IgG2a-tartalom. Az előzetes kísérletek során megfelelő szérumhígításokat választottuk (1:1350 az IgG1 és 1:50 IgG2a vizsgálatokhoz), így a szérum többségének OD értékei a vizsgálatban 3.00 alatt voltak. Az adatok azt mutatták, hogy a primer pVR-gBΔtm oltás indukálta az IgG1 altípus termelődését (az átlagos OD: 1.54±0.6 1. hónap+3. héten és 0.88±0.36 a 6. hónapban). A kialakult IgG1 szintet a gB emlékeztető oltás fokozta [átlagos OD: 2.7±0.23 a 6. hónap+3. héten (P<0.001)], és az átlagos IgG1 OD 2.7±0.4 a 9. hónapban (P<0.01 a boosterelt és nem boosterelt egerek esetében, valamint a pVR-pp65-tel oltott és gB alegységgel boosterelt egerek esetében **(68A ábra)**). Ezek az eredmények megegyeznek a pΔRC-gB680-nal végzett immunizálás által kiváltott magas IgG1 szinttel, amely a gB csonkolt, szekretált formáját fejezi ki [422]. A VR-gBΔtm oltás alacsony IgG2a antitestek szintet **(68B ábra)** indukált (átlagos OD: 0.64±0.32 és 0.83±0.4 az 1. hónap+3. héten és a 6. hónapban). Ezek a szintek emelkedtek a gB alegységgel végzett emlékeztető oltást követően (átlagos OD: 1.84±0.77 a 6. hónap+3. héten, és 2.08±0.7 a 9. hónapban, P<0.01 a boosterelt és nem boosterelt csoportok összehasonlításakor). A kontrollként pVR-pp65 DNS-sel oltott egerekben a gB alegység booster után nem indukálódtak IgG2a antitestek **(68B ábra)**.



68. ábra. *A gB protein booster hatása a pVR-gBΔtm plazmid által indukált IgG szubtípusokra. A: IgG1 szubtípus. B: IgG2a szubtípus. Egereket immunizáltunk majd az ábra tengelyén látható időpontokban szérumot nyertünk és gB specifikus ellenanyagot mértünk ELISA módszerrel. (O) és (Δ) 2x pVR-gBΔtm oltott; (◢) 2x pVR-gBΔtm és a 6. hónapban gB boosterelt; (□) 2x pVR-pp65 oltott; (■) 2x pVR-pp65 oltott és a 6. hónapban gB boosterelt egerek. A jelek individuális egerek szérumainak IgG1 és IgG2a OD értékeit mutatják.*

A teljes IgG ELISA eredményei nagyon hasonló OD értékeket mutattak a CBA egerekből nyert szérumokban jelezve, hogy az immunizált egerek genetikai háttere nem befolyásolta a gB specifikus antitestek kialakulását. A CBA egerekből származó szérum vírusneutralizáló titer **(69. ábra)** az emlékeztető oltás után körülbelül négyszeresére növekedett a 6. hónapban, a 9. hónapban pedig hatszorosára (GM titer 1:170 vagy 1:250, összehasonlítva a nem boosterelt egerek 1:40 értékével ugyanezen időpontokban). A neutralizáló titer alacsony maradt (1:30) a 9. hónapban azokban az egerekben, amelyeket kontroll pVR-pp65-tel oltottunk és gB alegységgel boostereltünk. Az egerekben a pVR-gBΔtm alapoltás és a gB boostert követő ellenanyagválasz eredményei összhangban állnak a HIV burok fehérje „prime-boost" kísérlet eredményeivel [428], valamint az előzetes canarypox-gB oltást követő gB emlékeztető oltás is magas szekunder antitestválaszt [429] eredményezett. A canarypox-gB prime oltás/gB booster protokoll direkt összehasonlítása az általunk alkalmazott pVR-gBΔtm prime/gB booster kísérlettel nagyon hasonló kötő és neutralizáló antitestválaszokat mutatott, ami arra utal, hogy mindkét protokoll alkalmas lehet emberben immunizálásra. IgG izotípusprofil tekintetében viszonylag magas IgG2a antitest szintet mértünk a pVR-gBΔtm-mel alapimmunizált egerekben a gB-boostert követően, viszont kontroll plazmiddal oltottak és gB-fehérjével boosterelt egerekben az ellenanyag szint nagyon alacsony volt hasonlóan a canarypox-gB prime/gB boost protokollal tapasztalthoz [429], jelezve, hogy a pVR-gBΔtm-mel történő priming az IgG altípusokat is meghatározza még az emlékeztető oltás után is. Az

egerekben lévő IgG2a antitestek feltételezhetően a Th1 típusú válasszal vannak kapcsolatban, jelezve az aktivált T helper sejtek fontosságát a CTL-ek számára [430].



69. ábra. *A gB protein booster oltás hatása a pVR-gBΔtm által indukált neutralizáló ellenanyagválaszra CBA egerekben. (□): 2x pVR-gBΔtm oltott; (◊): 2x pVR-gBΔtm oltott és gB boosterelt a 6. hónapban; X: 2x pVR-pp65 oltott; (Δ): 2x pVR-pp65 oltott és a 6. hónapban gB boosterelt egerek széruma. Az ábra az egerek neutralizáló titerének GM-jét mutatja a jelzett időpontokban.*

pVR-pp65 plazmiddal immunizált egerekben kialakult CTL válasz; az pIFN-α hatása a pp65-specifikus CTL és gB-specifikus antitest válaszra

A CTL indukcióhoz szükséges dózis meghatározása céljából 10 egérből álló csoportokat oltottunk be a quadriceps izomba, több helyre, két alkalommal, 10 hetes intervallumokban, 1, 12, 25 vagy 50 µg pVR-pp65 plazmidot alkalmazva, majd az első oltást követően 10-14 héttel feláldoztuk őket. A lépsejteket CTL-ek aktivitásának vizsgálatára használtuk. A CTL választ adó egerek száma egyértelműen mutatta a pVR-pp65 dózisfüggését, mivel 1 µg plazmid nem indukálta a CTL-ek kialakulását egyetlen egérben sem, míg 12 µg plazmid 10 egérből 4-ben, a 25 és 50 µg 10/5 és 10/6 egérben indukált CTL választ. Egy korábbi vizsgálatban [422] kimutatták, hogy a pΔRC-pp65 80 µg dózisban az egerek kb. 50%-ában indukálja a CTL-ek kialakulását. A naiv $CD8^+$ és $CD4^+$ T-sejtek akkor aktiválódnak, amikor T-sejt receptoruk megtalálja a megfelelő peptid/MHC komplexet az APC felületén. A T-sejtek aktiválását megnövelhetjük az MHC-I, II és a ko-stimuláló molekulák szintjének növelésével a $CD8^+$, $CD4^+$ T-sejtek és APC-k felületén. Az IFN-α aktiválja az érett dendritikus sejtekre jellemző morfológiai változásokat *in vitro*, továbbá az I és II osztályú HLA antigének magas szintű expresszióját, jelezve, hogy az IFN-α fontos szerepet játszik az antigénprezentáló DC-k fejlődésében [431]. Ezzel szemben az I. típusú IFN-okról (IFN-α és -β) kimutatták, hogy csökkentik az IFN-γ által indukált MHC-II expressziót [432], és gátolják mind az IL-12-függő, mind a független Th1 cytokin termelést, és a Th1 sejtek fejlődését dendritikus sejt/T-sejt tenyészetekben [433]. Ezért megvizsgáltuk, hogy az IFN-α-t kódoló plazmid-DNS egyidejű alkalmazása fokozhatja-e az antigénekre adott immunválaszt, amelyet egy másik plazmid expresszál. A kísérlet során csoportonként BALB/c egeret oltottuk be két alkalommal 1, 12, 25 vagy 50 µg pVR-pp65-tel 10 hetes időközönként, 12, 25 vagy 80 µg pIFN-α-val vagy 25 µg kontrollplazmiddal együtt (pΔRC). Az egereket az első oltás után 10–14 héten feláldoztuk, és a lép sejtjeit CTL tesztben vizsgáltuk. Az eredmények a pp65 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 együtt oltott csoportokban, sem a pΔRC kontroll plazmiddal oltottakban. Érdekes viszont, hogy mindegyik csoportban nagyobb számú egér mutatott pp65-specifikus ellenanyagválaszt ELISA-val meghatározva, mint a CTL választ. Ezek az adatok azt mutatják, hogy az egyéni különbségek nemcsak az ELISA tesztben kimutatott és a neutralizáló ellenanyagok kialakulásában vannak a pVR-gBΔtm-mel vagy pVR-gB-vel végzett immunizálást követően, hanem a pp65 specifikus ELISA ellenanyagok és a CTL válaszok kialakulásában is mutatkoznak. A pp65-specifikus ellenanyagok jelentősége a HCMV elleni immunitásban nem egyértelmű. Annak meghatározására, hogy az IFN-α befolyásolhatja-e a gB-specifikus antitest indukciót, BALB/c egereket oltottuk be kétszer, 8 hetes intervallumokban 1, 12 vagy 25 μg pVR-gBΔtm-mel (az előzetes kísérletek az antitestválasz platóját 25 μg-nál nagyobb dózisoknál jelezték) kombinálva a pIFN-α-val (12, 25 vagy 50 μg). Kontrollként 10 egeret oltottunk be ugyanolyan dózisú pVR-gBΔtm-mel és pΔRC-vel. A szérumot az első oltás után különböző időpontokban nyertük, és ELISA-val vizsgáltuk gB specifikus ellenanyagok jelenlétére. Az eredmények azt mutatták, hogy a gB-specifikus teljes IgG OD-értékei nem változtak, ha 1 vagy 25 μg pVR-gBΔtm-et különféle pIFN-α-dózisokkal koinokuláltuk. Ugyanakkor 12 μg VR-gBΔtm és 12 μg pIFN-α együttesen növelte a szérumok össz IgG OD értékét az összes időpontban, bár a növekedés az első oltás után csak a 7. és 12. héten volt statisztikailag szignifikáns. 12 μg pVR-gBΔtm-mel és 25 vagy 50 μg pIFN-α-val beoltott egerek széruma mérsékelt, de statisztikailag nem szignifikáns növekedést mutatott az össz IgG OD értékben Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a pIFN-α és a VR-gBΔtm együttes alkalmazása bizonyos dózisokban fokozza a specifikus antitest választ. Mivel az egerekben jelenlevő IFN-α dózis kritikus lehet az ellenanyag vagy a CTL indukció fokozásában, további vizsgálatokra van szükség a pIFN-α alacsonyabb vagy magasabb dózisának alkalmazásával. Az egérkísérletben leírt eredményeink fontos adatokkal szolgálnak a CMV pp65 és gB protein által indukált immunválasz jobb megértéséhez, a DNS-immunizálás módjának optimalizálásához, valamint az egymás után használt különböző alapú vakcinák immunválaszt fokozó hatásával kapcsolatban, melynek a jelenleg is folyó SARS-CoV-2 járvány elleni vakcinációs stratégiákban is nagy jelentőséget tulajdonítanak [434].

Összefoglalás

Munkánk eredményeként az alábbi új megállapításokat tettük ezen témában:

1. Vizsgálatunk kimutatta, hogy az IE1-exon4 fehérje csaknem ugyanolyan elterjedt CTL célpont, mint a pp65. A gB és a pp150 specifikus CTL-ek a CMV szeropozitív donorok körülbelül egyharmadában mutathatók ki; a pp28 nem immundomináns CTL célpont.
2. 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.

3. A citotoxicitási vizsgálatok szerint a pp65 specifikus ölésben a $CD8^+$ fenotípusú, míg az IE1-exon4 specifikus lízisben mind a $CD4^+$, mind a $CD8^+$ CTL-ek részt vehetnek.
4. A bupivakain előkezelés nem fokozta a pVR-gBΔtm DNS vakcinánk hatékonyságát.
5. Az ellenanyagválasz minden vizsgált időpontban magasabb volt azokban az egerekben, amelyeket a quadriceps három helyén oltottuk összehasonlítva az egy helyen oltott egerek eredményeivel.
6. A pVR-gBΔtm DNS vakcinával alapimmunizált BALB/c egerekben, a gB alegység booster oltás szignifikánsan növelte a gB specifikus ellenanyagszintet.
7. Az alacsony dózisban alkalmazott pVR-pp65 DNS vakcina nem indukálta a CTL-ek kialakulását egerekben, a magasabb dózisban viszont az egerek felében CTL aktivitást eredményezett, ugyanakkor a pp65-specifikus CTL-választ mutatott egerek száma nem növekedett, ha a pVR-pp65-öt és a pIFN-α-t együtt oltottuk, viszont a pIFN-α és a VR-gBΔtm együttes alkalmazása bizonyos dózisokban fokozta a specifikus antitest választ.

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 $CD4^+$ sejtek felelősek. Bizonyítottuk, hogy az IL-17A *in vivo* neutralizálása csökkent chemokin termelődéshez és neutrophil granulocyta 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 pathogén gastrointestinális túléléséhez, valamint az onnan történő rekurrens genitális fertőzésekhez.

4. Bizonyítottuk, hogy az ApoB100only/LDLR$^{-/-}$ 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-γ 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 molekulasúlyú proteinje felelős.
7. Génexpressziós, hisztopatológiai, funkcionális valamint *in vivo* neutralizációs vizsgálattal is bizonyítottuk, hogy az IDO kifejeződik és anti-mikrobiális hatással rendelkezik chlamydia fertőzött egerekben.
8. Kimutattuk, hogy a *C. pneumoniae* fertőzött DC szubpopuláció IFN-γ 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 dózisnak 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 cytokinek 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 $CD8^+$ fenotípusú, míg az IE1-exon4 specifikus lízisben mind a $CD4^+$, mind a $CD8^+$ 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 rögös útjain. Az Ő meglátásai, tanácsai és segítsége 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 belefektettek 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 is munkájukért.
Szeretném megköszönni Paraginé Zsótér Gizella, Lévai Istvánné, Müllerné **Deák Györgyi** és **Vigyikánné Váradi 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 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 családomnak, drága **Anyukámnak,** valamint lányaimnak, **Bettinának** és **Anettnak** a támogatásukért, akik mindig feltétel nélkül hittek az anyukájukban, hogy mindenre képes.

7. Irodalomjegyzék

[1] K. D. Everett, R. M. Bush, és A. A. Andersen, „Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms”, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, köt. 49 Pt 2, o. 415–440, ápr. 1999.

[2] K. Sachse *és mtsai.*, „Emendation of the family Chlamydiaceae: proposal of a single genus, Chlamydia, to include all currently recognized species”, *Syst. Appl. Microbiol.*, köt. 38, sz. 2, o. 99–103, márc. 2015, doi: 10.1016/j.syapm.2014.12.004.

[3] G. J. Galasso és G. P. Manire, „Effect of antiserum and antibiotics on persistent infection of HeLa cells with meningopneumonitis virus”, *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, köt. 86, o. 382–385, ápr. 1961.

[4] A. Matsumoto és G. P. Manire, „Electron microscopic observations on the effects of penicillin on the morphology of Chlamydia psittaci”, *J. Bacteriol.*, köt. 101, sz. 1, o. 278–285, 0 1970.

[5] R. V. Schoborg, „Chlamydia persistence -- a tool to dissect chlamydia--host interactions”, *Microbes Infect. Inst. Pasteur*, köt. 13, sz. 7, o. 649–662, júl. 2011, doi: 10.1016/j.micinf.2011.03.004.

[6] H. D. Caldwell, J. Kromhout, és J. Schachter, „Purification and partial characterization of the major outer membrane protein of Chlamydia trachomatis”, *Infect. Immun.*, köt. 31, sz. 3, o. 1161–1176, márc. 1981.

[7] G. Sun *és mtsai.*, „Structural and functional analyses of the major outer membrane protein of Chlamydia trachomatis”, *J. Bacteriol.*, köt. 189, sz. 17, o. 6222–6235, szept. 2007, doi: 10.1128/JB.00552-07.

[8] H. Su, N. G. Watkins, Y. X. Zhang, és H. D. Caldwell, „Chlamydia trachomatis-host cell interactions: role of the chlamydial major outer membrane protein as an adhesin”, *Infect. Immun.*, köt. 58, sz. 4, o. 1017–1025, ápr. 1990.

[9] A. Nunes, M. J. Borrego, B. Nunes, C. Florindo, és J. P. Gomes, „Evolutionary dynamics of ompA, the gene encoding the Chlamydia trachomatis key antigen”, *J. Bacteriol.*, köt. 191, sz. 23, o. 7182–7192, 0 2009, doi: 10.1128/JB.00895-09.

[10] J. E. Galán és A. Collmer, „Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells”, *Science*, köt. 284, sz. 5418, o. 1322–1328, máj. 1999.

[11] J. J. Mecsas és E. J. Strauss, „Molecular mechanisms of bacterial virulence: type III secretion and pathogenicity islands”, *Emerg. Infect. Dis.*, köt. 2, sz. 4, o. 270–288, dec. 1996, doi: 10.3201/eid0204.960403.

[12] P. S. Hefty és R. S. Stephens, „Chlamydial type III secretion system is encoded on ten operons preceded by sigma 70-like promoter elements”, *J. Bacteriol.*, köt. 189, sz. 1, o. 198–206, 0 2007, doi: 10.1128/JB.01034-06.

[13] N. Qureshi *és mtsai.*, „Structure of the monophosphoryl lipid A moiety obtained from the lipopolysaccharide of Chlamydia trachomatis”, *J. Biol. Chem.*, köt. 272, sz. 16, o. 10594–10600, ápr. 1997.

[14] H. Heine, S. Müller-Loennies, L. Brade, B. Lindner, és H. Brade, „Endotoxic activity and chemical structure of lipopolysaccharides from Chlamydia trachomatis serotypes E and L2 and Chlamydophila psittaci 6BC”, *Eur. J. Biochem. FEBS*, köt. 270, sz. 3, o. 440–450, febr. 2003.

[15] S. P. Dhir, S. Hakomori, G. E. Kenny, és J. T. Grayston, „Immunochemical studies on chlamydial group antigen (presence of a 2-keto-3-deoxycarbohydrate as immunodominant group)”, *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, köt. 109, sz. 1, o. 116–122, júl. 1972.

[16] R. J. Belland *és mtsai.*, „Chlamydia trachomatis cytotoxicity associated with complete and partial cytotoxin genes”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, köt. 98, sz. 24, o. 13984–13989, 0 2001, doi: 10.1073/pnas.241377698.
[17] J. H. Carlson *és mtsai.*, „Polymorphisms in the Chlamydia trachomatis cytotoxin locus associated with ocular and genital isolates”, *Infect. Immun.*, köt. 72, sz. 12, o. 7063–7072, 0 2004, doi: 10.1128/IAI.72.12.7063-7072.2004.
[18] A. Kol, A. H. Lichtman, R. W. Finberg, P. Libby, és E. A. Kurt-Jones, „Cutting edge: heat shock protein (HSP) 60 activates the innate immune response: CD14 is an essential receptor for HSP60 activation of mononuclear cells”, *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, köt. 164, sz. 1, o. 13–17, 0 2000.
[19] R. S. Stephens *és mtsai.*, „Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: Chlamydia trachomatis”, *Science*, köt. 282, sz. 5389, o. 754–759, okt. 1998.
[20] D. D. Rockey, J. Lenart, és R. S. Stephens, „Genome sequencing and our understanding of chlamydiae”, *Infect. Immun.*, köt. 68, sz. 10, o. 5473–5479, okt. 2000.
[21] K. A. Swanson *és mtsai.*, „Chlamydia trachomatis polymorphic membrane protein D is an oligomeric autotransporter with a higher-order structure”, *Infect. Immun.*, köt. 77, sz. 1, o. 508–516, 0 2009, doi: 10.1128/IAI.01173-08.
[22] I. R. Henderson és J. P. Nataro, „Virulence functions of autotransporter proteins”, *Infect. Immun.*, köt. 69, sz. 3, o. 1231–1243, márc. 2001, doi: 10.1128/IAI.69.3.1231-1243.2001.
[23] D. C. W. Mabey, A. W. Solomon, és A. Foster, „Trachoma”, *Lancet*, köt. 362, sz. 9379, o. 223–229, júl. 2003, doi: 10.1016/S0140-6736(03)13914-1.
[24] „Eliminating trachoma: WHO announces sustained progress with hundreds of millions of people no longer at risk of infection”. https://www.who.int/news-room/detail/27-06-2019-eliminating-trachoma-who-announces-sustained-progress-with-hundreds-of-millions-of-people-no-longer-at-risk-of-infection (elérés okt. 09, 2020).
[25] R. C. Brunham és R. Rappuoli, „Chlamydia trachomatis control requires a vaccine”, *Vaccine*, köt. 31, sz. 15, o. 1892–1897, ápr. 2013, doi: 10.1016/j.vaccine.2013.01.024.
[26] R. E. Johnson *és mtsai.*, „Screening tests to detect Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae infections--2002”, *MMWR Recomm. Rep. Morb. Mortal. Wkly. Rep. Recomm. Rep. Cent. Dis. Control*, köt. 51, sz. RR-15, o. 1–38; quiz CE1-4, okt. 2002.
[27] J. F. Peipert, „Clinical practice. Genital chlamydial infections”, *N. Engl. J. Med.*, köt. 349, sz. 25, o. 2424–2430, 0 2003, doi: 10.1056/NEJMcp030542.
[28] R. C. Brunham *és mtsai.*, „Mucopurulent cervicitis--the ignored counterpart in women of urethritis in men”, *N. Engl. J. Med.*, köt. 311, sz. 1, o. 1–6, júl. 1984, doi: 10.1056/NEJM198407053110101.
[29] R. C. Brunham *és mtsai.*, „Etiology and outcome of acute pelvic inflammatory disease”, *J. Infect. Dis.*, köt. 158, sz. 3, o. 510–517, szept. 1988.
[30] R. S. Stephens, „The cellular paradigm of chlamydial pathogenesis”, *Trends Microbiol.*, köt. 11, sz. 1, o. 44–51, 0 2003.
[31] S. J. Rasmussen *és mtsai.*, „Secretion of proinflammatory cytokines by epithelial cells in response to Chlamydia infection suggests a central role for epithelial cells in chlamydial pathogenesis”, *J. Clin. Invest.*, köt. 99, sz. 1, o. 77–87, 0 1997, doi: 10.1172/JCI119136.
[32] R. C. Brunham és J. Rey-Ladino, „Immunology of Chlamydia infection: implications for a Chlamydia trachomatis vaccine”, *Nat. Rev. Immunol.*, köt. 5, sz. 2, o. 149–161, febr. 2005, doi: 10.1038/nri1551.
[33] J. T. Grayston, S. P. Wang, L. J. Yeh, és C. C. Kuo, „Importance of reinfection in the pathogenesis of trachoma”, *Rev. Infect. Dis.*, köt. 7, sz. 6, o. 717–725, dec. 1985.
[34] R. B. Ness *és mtsai.*, „Chlamydia antibodies, chlamydia heat shock protein, and adverse sequelae after pelvic inflammatory disease: the PID Evaluation and Clinical Health (PEACH) Study”, *Sex. Transm. Dis.*, köt. 35, sz. 2, o. 129–135, febr. 2008.

[35] C. R. Cohen *és mtsai.*, „Immunoepidemiologic profile of Chlamydia trachomatis infection: importance of heat-shock protein 60 and interferon- gamma”, *J. Infect. Dis.*, köt. 192, sz. 4, o. 591–599, 0 2005, doi: 10.1086/432070.
[36] R. G. Rank, C. Dascher, A. K. Bowlin, és P. M. Bavoil, „Systemic immunization with Hsp60 alters the development of chlamydial ocular disease”, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, köt. 36, sz. 7, o. 1344–1351, jún. 1995.
[37] R. W. Peeling *és mtsai.*, „Antibody to chlamydial hsp60 predicts an increased risk for chlamydial pelvic inflammatory disease”, *J. Infect. Dis.*, köt. 175, sz. 5, o. 1153–1158, máj. 1997.
[38] B. Toye, C. Laferrière, P. Claman, P. Jessamine, és R. Peeling, „Association between antibody to the chlamydial heat-shock protein and tubal infertility”, *J. Infect. Dis.*, köt. 168, sz. 5, o. 1236–1240, 0 1993.
[39] M. L. Rekart *és mtsai.*, „Chlamydia public health programs and the epidemiology of pelvic inflammatory disease and ectopic pregnancy”, *J. Infect. Dis.*, köt. 207, sz. 1, o. 30–38, 0 2013, doi: 10.1093/infdis/jis644.
[40] G. Zhong, P. Fan, H. Ji, F. Dong, és Y. Huang, „Identification of a chlamydial protease-like activity factor responsible for the degradation of host transcription factors”, *J. Exp. Med.*, köt. 193, sz. 8, o. 935–942, ápr. 2001.
[41] R. P. Morrison, K. Feilzer, és D. B. Tumas, „Gene knockout mice establish a primary protective role for major histocompatibility complex class II-restricted responses in Chlamydia trachomatis genital tract infection”, *Infect. Immun.*, köt. 63, sz. 12, o. 4661–4668, 0 1995.
[42] H. Su és H. D. Caldwell, „CD4+ T cells play a significant role in adoptive immunity to Chlamydia trachomatis infection of the mouse genital tract”, *Infect. Immun.*, köt. 63, sz. 9, o. 3302–3308, szept. 1995.
[43] S. G. Morrison és R. P. Morrison, „A predominant role for antibody in acquired immunity to chlamydial genital tract reinfection”, *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, köt. 175, sz. 11, o. 7536–7542, 0 2005.
[44] L. L. Perry *és mtsai.*, „Differential sensitivity of distinct Chlamydia trachomatis isolates to IFN-gamma-mediated inhibition”, *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, köt. 162, sz. 6, o. 3541–3548, márc. 1999.
[45] B. E. Batteiger, F. Xu, R. E. Johnson, és M. L. Rekart, „Protective immunity to Chlamydia trachomatis genital infection: evidence from human studies”, *J. Infect. Dis.*, köt. 201 Suppl 2, o. S178-189, jún. 2010.
[46] T. Agrawal, V. Vats, S. Salhan, és A. Mittal, „Mucosal and peripheral immune responses to chlamydial heat shock proteins in women infected with Chlamydia trachomatis”, *Clin. Exp. Immunol.*, köt. 148, sz. 3, o. 461–468, jún. 2007, doi: 10.1111/j.1365-2249.2007.03357.x.
[47] J. Mestecky, Z. Moldoveanu, és M. W. Russell, „Immunologic uniqueness of the genital tract: challenge for vaccine development”, *Am. J. Reprod. Immunol. N. Y. N 1989*, köt. 53, sz. 5, o. 208–214, máj. 2005, doi: 10.1111/j.1600-0897.2005.00267.x.
[48] P. A. Kozlowski *és mtsai.*, „Differential induction of mucosal and systemic antibody responses in women after nasal, rectal, or vaginal immunization: influence of the menstrual cycle”, *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, köt. 169, sz. 1, o. 566–574, júl. 2002.
[49] G. Stary *és mtsai.*, „New Chlamydia trachomatis L2 strains identified in a recent outbreak of lymphogranuloma venereum in Vienna, Austria”, *Sex. Transm. Dis.*, köt. 35, sz. 4, o. 377–382, ápr. 2008, doi: 10.1097/OLQ.0b013e31815d6df8.
[50] R. F. Nieuwenhuis *és mtsai.*, „Resurgence of lymphogranuloma venereum in Western Europe: an outbreak of Chlamydia trachomatis serovar l2 proctitis in The Netherlands among men who have sex with men”, *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.*, köt. 39, sz. 7, o. 996–1003, okt. 2004, doi: 10.1086/423966.

[51] A. L. Barron, H. J. White, R. G. Rank, B. L. Soloff, és E. B. Moses, „A new animal model for the study of Chlamydia trachomatis genital infections: infection of mice with the agent of mouse pneumonitis”, *J. Infect. Dis.*, köt. 143, sz. 1, o. 63–66, 0 1981.
[52] T. D. Read *és mtsai.*, „Genome sequences of Chlamydia trachomatis MoPn and Chlamydia pneumoniae AR39”, *Nucleic Acids Res.*, köt. 28, sz. 6, o. 1397–1406, márc. 2000.
[53] D. E. Nelson *és mtsai.*, „Chlamydial IFN-gamma immune evasion is linked to host infection tropism”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, köt. 102, sz. 30, o. 10658–10663, júl. 2005, doi: 10.1073/pnas.0504198102.
[54] R. P. Morrison és H. D. Caldwell, „Immunity to murine chlamydial genital infection”, *Infect. Immun.*, köt. 70, sz. 6, o. 2741–2751, jún. 2002.
[55] S. G. Morrison és R. P. Morrison, „In situ analysis of the evolution of the primary immune response in murine Chlamydia trachomatis genital tract infection”, *Infect. Immun.*, köt. 68, sz. 5, o. 2870–2879, máj. 2000.
[56] K. H. Ramsey, J. L. DeWolfe, és R. D. Salyer, „Disease outcome subsequent to primary and secondary urogenital infection with murine or human biovars of Chlamydia trachomatis”, *Infect. Immun.*, köt. 68, sz. 12, o. 7186–7189, 0 2000.
[57] D. M. Williams, B. G. Grubbs, E. Pack, K. Kelly, és R. G. Rank, „Humoral and cellular immunity in secondary infection due to murine Chlamydia trachomatis”, *Infect. Immun.*, köt. 65, sz. 7, o. 2876–2882, júl. 1997.
[58] T. Darville, C. W. Andrews, K. K. Laffoon, W. Shymasani, L. R. Kishen, és R. G. Rank, „Mouse strain-dependent variation in the course and outcome of chlamydial genital tract infection is associated with differences in host response”, *Infect. Immun.*, köt. 65, sz. 8, o. 3065–3073, 0 1997.
[59] M. Tuffrey, F. Alexander, és D. Taylor-Robinson, „Severity of salpingitis in mice after primary and repeated inoculation with a human strain of Chlamydia trachomatis”, *J. Exp. Pathol. Oxf. Engl.*, köt. 71, sz. 3, o. 403–410, jún. 1990.
[60] L. Hafner, K. Beagley, és P. Timms, „Chlamydia trachomatis infection: host immune responses and potential vaccines”, *Mucosal Immunol.*, köt. 1, sz. 2, o. 116–130, márc. 2008, doi: 10.1038/mi.2007.19.
[61] R. Finethy és J. Coers, „Sensing the enemy, containing the threat: cell-autonomous immunity to Chlamydia trachomatis”, *FEMS Microbiol. Rev.*, köt. 40, sz. 6, o. 875–893, 01 2016, doi: 10.1093/femsre/fuw027.
[62] G. I. Byrne, L. K. Lehmann, és G. J. Landry, „Induction of tryptophan catabolism is the mechanism for gamma-interferon-mediated inhibition of intracellular Chlamydia psittaci replication in T24 cells”, *Infect. Immun.*, köt. 53, sz. 2, o. 347–351, 0 1986.
[63] C. Roshick, H. Wood, H. D. Caldwell, és G. McClarty, „Comparison of gamma interferon-mediated antichlamydial defense mechanisms in human and mouse cells”, *Infect. Immun.*, köt. 74, sz. 1, o. 225–238, 0 2006, doi: 10.1128/IAI.74.1.225-238.2006.
[64] J. Coers *és mtsai.*, „Chlamydia muridarum evades growth restriction by the IFN-gamma-inducible host resistance factor Irgb10”, *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, köt. 180, sz. 9, o. 6237–6245, máj. 2008, doi: 10.4049/jimmunol.180.9.6237.
[65] M. W. Carter, S. A. al-Mahdawi, I. G. Giles, J. D. Treharne, M. E. Ward, és I. N. Clark, „Nucleotide sequence and taxonomic value of the major outer membrane protein gene of Chlamydia pneumoniae IOL-207”, *J. Gen. Microbiol.*, köt. 137, sz. 3, o. 465–475, márc. 1991.
[66] B. Kaltenboeck, K. G. Kousoulas, és J. Storz, „Structures of and allelic diversity and relationships among the major outer membrane protein (ompA) genes of the four chlamydial species”, *J. Bacteriol.*, köt. 175, sz. 2, o. 487–502, 0 1993.
[67] M. P. Melgosa, C. C. Kuo, és L. A. Campbell, „Outer membrane complex proteins of Chlamydia pneumoniae”, *FEMS Microbiol. Lett.*, köt. 112, sz. 2, o. 199–204, szept. 1993.

[68] Y. Iijima, N. Miyashita, T. Kishimoto, Y. Kanamoto, R. Soejima, és A. Matsumoto, „Characterization of Chlamydia pneumoniae species-specific proteins immunodominant in humans”, *J. Clin. Microbiol.*, köt. 32, sz. 3, o. 583–588, márc. 1994.
[69] M. W. Watson, S. al-Mahdawi, P. R. Lamden, és I. N. Clarke, „The nucleotide sequence of the 60 kDa cysteine rich outer membrane protein of Chlamydia pneumoniae strain IOL-207”, *Nucleic Acids Res.*, köt. 18, sz. 17, o. 5299, szept. 1990.
[70] L. C. Kikuta, M. Puolakkainen, C. C. Kuo, és L. A. Campbell, „Isolation and sequence analysis of the Chlamydia pneumoniae GroE operon”, *Infect. Immun.*, köt. 59, sz. 12, o. 4665–4669, dec. 1991.
[71] J. M. Kornak, C. C. Kuo, és L. A. Campbell, „Sequence analysis of the gene encoding the Chlamydia pneumoniae DnaK protein homolog”, *Infect. Immun.*, köt. 59, sz. 2, o. 721–725, febr. 1991.
[72] I. W. Maclean, R. W. Peeling, és R. C. Brunham, „Characterization of Chlamydia trachomatis antigens with monoclonal and polyclonal antibodies”, *Can. J. Microbiol.*, köt. 34, sz. 2, o. 141–147, febr. 1988.
[73] R. P. Morrison, K. Lyng, és H. D. Caldwell, „Chlamydial disease pathogenesis. Ocular hypersensitivity elicited by a genus-specific 57-kD protein”, *J. Exp. Med.*, köt. 169, sz. 3, o. 663–675, márc. 1989.
[74] L. A. Campbell, C. C. Kuo, S. P. Wang, és J. T. Grayston, „Serological response to Chlamydia pneumoniae infection”, *J. Clin. Microbiol.*, köt. 28, sz. 6, o. 1261–1264, jún. 1990.
[75] G. R. Cornelis és F. Van Gijsegem, „Assembly and function of type III secretory systems”, *Annu. Rev. Microbiol.*, köt. 54, o. 735–774, 2000, doi: 10.1146/annurev.micro.54.1.735.
[76] C. J. Hueck, „Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants”, *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR*, köt. 62, sz. 2, o. 379–433, jún. 1998.
[77] A. Forsberg, A. M. Viitanen, M. Skurnik, és H. Wolf-Watz, „The surface-located YopN protein is involved in calcium signal transduction in Yersinia pseudotuberculosis”, *Mol. Microbiol.*, köt. 5, sz. 4, o. 977–986, ápr. 1991.
[78] S. Montigiani *és mtsai.*, „Genomic approach for analysis of surface proteins in Chlamydia pneumoniae”, *Infect. Immun.*, köt. 70, sz. 1, o. 368–379, 0 2002.
[79] M. Herrmann, A. Schuhmacher, I. Mühldorfer, K. Melchers, C. Prothmann, és S. Dammeier, „Identification and characterization of secreted effector proteins of Chlamydophila pneumoniae TW183”, *Res. Microbiol.*, köt. 157, sz. 6, o. 513–524, aug. 2006, doi: 10.1016/j.resmic.2005.12.005.
[80] A. Slepenkin, V. Motin, L. M. de la Maza, és E. M. Peterson, „Temporal expression of type III secretion genes of Chlamydia pneumoniae”, *Infect. Immun.*, köt. 71, sz. 5, o. 2555–2562, máj. 2003.
[81] M. R. Hammerschlag, „Chlamydia pneumoniae and the lung”, *Eur. Respir. J.*, köt. 16, sz. 5, o. 1001–1007, 0 2000.
[82] T. J. Marrie, R. W. Peeling, T. Reid, E. De Carolis, és Canadian Community-Acquired Pneumonia Investigators, „Chlamydia species as a cause of community-acquired pneumonia in Canada”, *Eur. Respir. J.*, köt. 21, sz. 5, o. 779–784, máj. 2003.
[83] K. Burián *és mtsai.*, „Chlamydophila (Chlamydia) pneumoniae induces histidine decarboxylase production in the mouse lung”, *Immunol. Lett.*, köt. 89, sz. 2–3, o. 229–236, okt. 2003.
[84] J. Gieffers *és mtsai.*, „Chlamydia pneumoniae infection in circulating human monocytes is refractory to antibiotic treatment”, *Circulation*, köt. 103, sz. 3, o. 351–356, 0 2001.
[85] L. A. Campbell *és mtsai.*, „Detection of Chlamydia pneumoniae TWAR in human coronary atherectomy tissues”, *J. Infect. Dis.*, köt. 172, sz. 2, o. 585–588, 0 1995.
[86] M. Smieja, J. Mahony, A. Petrich, J. Boman, és M. Chernesky, „Association of circulating Chlamydia pneumoniae DNA with cardiovascular disease: a systematic review”, *BMC Infect. Dis.*, köt. 2, o. 21, okt. 2002.

[87] Y. Shi *és mtsai.*, „The pathogenesis of Chlamydia pneumoniae-type pneumonitis in mice”, *Chin. Med. J. (Engl.)*, köt. 116, sz. 3, o. 328–332, márc. 2003.
[88] D. L. Hahn, R. W. Dodge, és R. Golubjatnikov, „Association of Chlamydia pneumoniae (strain TWAR) infection with wheezing, asthmatic bronchitis, and adult-onset asthma”, *JAMA*, köt. 266, sz. 2, o. 225–230, júl. 1991.
[89] S. Esposito *és mtsai.*, „Importance of acute Mycoplasma pneumoniae and Chlamydia pneumoniae infections in children with wheezing”, *Eur. Respir. J.*, köt. 16, sz. 6, o. 1142–1146, 0 2000.
[90] D. Lieberman *és mtsai.*, „Atypical pathogen infection in adults with acute exacerbation of bronchial asthma”, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, köt. 167, sz. 3, o. 406–410, febr. 2003, doi: 10.1164/rccm.200209-996OC.
[91] R. Cosentini *és mtsai.*, „Severe asthma exacerbation: role of acute Chlamydophila pneumoniae and Mycoplasma pneumoniae infection”, *Respir. Res.*, köt. 9, o. 48, 2008, doi: 10.1186/1465-9921-9-48.
[92] F. Blasi *és mtsai.*, „Chlamydia pneumoniae infection in acute exacerbations of COPD”, *Eur. Respir. J.*, köt. 6, sz. 1, o. 19–22, 0 1993.
[93] L. Von Hertzen *és mtsai.*, „Chlamydia pneumoniae infection in patients with chronic obstructive pulmonary disease”, *Epidemiol. Infect.*, köt. 118, sz. 2, o. 155–164, ápr. 1997.
[94] D. Theegarten, G. Mogilevski, O. Anhenn, G. Stamatis, R. Jaeschock, és K. Morgenroth, „The role of chlamydia in the pathogenesis of pulmonary emphysema. Electron microscopy and immunofluorescence reveal corresponding findings as in atherosclerosis”, *Virchows Arch. Int. J. Pathol.*, köt. 437, sz. 2, o. 190–193, aug. 2000.
[95] L. Wu, S. J. Skinner, N. Lambie, J. C. Vuletic, F. Blasi, és P. N. Black, „Immunohistochemical staining for Chlamydia pneumoniae is increased in lung tissue from subjects with chronic obstructive pulmonary disease”, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, köt. 162, sz. 3 Pt 1, o. 1148–1151, szept. 2000, doi: 10.1164/ajrccm.162.3.9912134.
[96] F. Blasi *és mtsai.*, „Chlamydia pneumoniae and chronic bronchitis: association with severity and bacterial clearance following treatment”, *Thorax*, köt. 57, sz. 8, o. 672–676, 0 2002.
[97] A. Nagy, G. T. Kozma, M. Keszei, A. Treszl, A. Falus, és C. Szalai, „The development of asthma in children infected with Chlamydia pneumoniae is dependent on the modifying effect of mannose-binding lectin”, *J. Allergy Clin. Immunol.*, köt. 112, sz. 4, o. 729–734, okt. 2003, doi: 10.1016/S0091.
[98] F. Blasi *és mtsai.*, „Chlamydophila pneumoniae induces a sustained airway hyperresponsiveness and inflammation in mice”, *Respir. Res.*, köt. 8, o. 83, 2007, doi: 10.1186/1465-9921-8-83.
[99] P. Saikku *és mtsai.*, „Serological evidence of an association of a novel Chlamydia, TWAR, with chronic coronary heart disease and acute myocardial infarction”, *Lancet*, köt. 2, sz. 8618, o. 983–986, okt. 1988.
[100] K. Burian *és mtsai.*, „Independent and joint effects of antibodies to human heat-shock protein 60 and Chlamydia pneumoniae infection in the development of coronary atherosclerosis”, *Circulation*, köt. 103, sz. 11, o. 1503–1508, márc. 2001.
[101] S. Rugonfalvi-Kiss *és mtsai.*, „Association of Chlamydia pneumoniae with coronary artery disease and its progression is dependent on the modifying effect of mannose-binding lectin”, *Circulation*, köt. 106, sz. 9, o. 1071–1076, 0 2002.
[102] K. Heltai *és mtsai.*, „Elevated antibody levels against Chlamydia pneumoniae, human HSP60 and mycobacterial HSP65 are independent risk factors in myocardial infarction and ischaemic heart disease”, *Atherosclerosis*, köt. 173, sz. 2, o. 339–346, ápr. 2004, doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2003.12.026.
[103] D. Virok *és mtsai.*, „Chlamydia pneumoniae in atherosclerotic middle cerebral artery”, *Stroke J. Cereb. Circ.*, köt. 32, sz. 9, o. 1973–1976, szept. 2001.

[104] J. A. Ramirez, „Isolation of Chlamydia pneumoniae from the coronary artery of a patient with coronary atherosclerosis. The Chlamydia pneumoniae/Atherosclerosis Study Group”, *Ann. Intern. Med.*, köt. 125, sz. 12, o. 979–982, 0 1996.

[105] K. Burian *és mtsai.*, „Chlamydia pneumoniae exacerbates aortic inflammatory foci caused by murine cytomegalovirus infection in normocholesterolemic mice”, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, köt. 8, sz. 6, o. 1263–1266, 0 2001, doi: 10.1128/CDLI.8.6.1263-1266.2001.

[106] Z. Kis *és mtsai.*, „A soluble factor(s) released by MRC-5 cells early and late after human cytomegalovirus infection induces maturation of monocyte-derived dendritic cells”, *Arch. Virol.*, köt. 151, sz. 11, o. 2277–2287, 0 2006, doi: 10.1007/s00705-006-0799-7.

[107] J. B. Muhlestein *és mtsai.*, „Infection with Chlamydia pneumoniae accelerates the development of atherosclerosis and treatment with azithromycin prevents it in a rabbit model”, *Circulation*, köt. 97, sz. 7, o. 633–636, febr. 1998.

[108] F. R. Kapourchali, G. Surendiran, L. Chen, E. Uitz, B. Bahadori, és M. H. Moghadasian, „Animal models of atherosclerosis”, *World J. Clin. Cases*, köt. 2, sz. 5, o. 126–132, máj. 2014, doi: 10.12998/wjcc.v2.i5.126.

[109] L. Powell-Braxton *és mtsai.*, „A mouse model of human familial hypercholesterolemia: markedly elevated low density lipoprotein cholesterol levels and severe atherosclerosis on a low-fat chow diet”, *Nat. Med.*, köt. 4, sz. 8, o. 934–938, 0 1998, doi: 10.1038/nm0898-934.

[110] A. S. Plump *és mtsai.*, „Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells”, *Cell*, köt. 71, sz. 2, o. 343–353, okt. 1992, doi: 10.1016/0092-8674(92)90362-g.

[111] D. J. Rader és G. A. FitzGerald, „State of the art: atherosclerosis in a limited edition”, *Nat. Med.*, köt. 4, sz. 8, o. 899–900, 0 1998, doi: 10.1038/nm0898-899.

[112] Y. V. Bobryshev *és mtsai.*, „Detection of Chlamydophila pneumoniae in dendritic cells in atherosclerotic lesions”, *Atherosclerosis*, köt. 173, sz. 2, o. 185–195, ápr. 2004, doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2003.12.028.

[113] A. D. Wagner *és mtsai.*, „Detection of Chlamydia pneumoniae in giant cell vasculitis and correlation with the topographic arrangement of tissue-infiltrating dendritic cells”, *Arthritis Rheum.*, köt. 43, sz. 7, o. 1543–1551, júl. 2000, doi: 10.1002/1529-0131(200007)43:7<1543::AID-ANR19>3.0.CO;2-8.

[114] J. Boman *és mtsai.*, „High prevalence of Chlamydia pneumoniae DNA in peripheral blood mononuclear cells in patients with cardiovascular disease and in middle-aged blood donors”, *J. Infect. Dis.*, köt. 178, sz. 1, o. 274–277, júl. 1998.

[115] R. M. Steinman, „Some interfaces of dendritic cell biology”, *APMIS Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.*, köt. 111, sz. 7–8, o. 675–697, aug. 2003.

[116] P. Ye *és mtsai.*, „Interleukin-17 and lung host defense against Klebsiella pneumoniae infection”, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, köt. 25, sz. 3, o. 335–340, szept. 2001, doi: 10.1165/ajrcmb.25.3.4424.

[117] M. Umemura *és mtsai.*, „IL-17-mediated regulation of innate and acquired immune response against pulmonary Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guerin infection”, *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, köt. 178, sz. 6, o. 3786–3796, márc. 2007.

[118] S. J. Park és Y. C. Lee, „Interleukin-17 regulation: an attractive therapeutic approach for asthma”, *Respir. Res.*, köt. 11, o. 78, 2010, doi: 10.1186/1465-9921-11-78.

[119] R. H. Wilson, G. S. Whitehead, H. Nakano, M. E. Free, J. K. Kolls, és D. N. Cook, „Allergic sensitization through the airway primes Th17-dependent neutrophilia and airway hyperresponsiveness”, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, köt. 180, sz. 8, o. 720–730, okt. 2009, doi: 10.1164/rccm.200904-0573OC.

[120] S. L. Gaffen, „An overview of IL-17 function and signaling”, *Cytokine*, köt. 43, sz. 3, o. 402–407, szept. 2008, doi: 10.1016/j.cyto.2008.07.017.

[121] C. T. Weaver, R. D. Hatton, P. R. Mangan, és L. E. Harrington, „IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages”, *Annu. Rev. Immunol.*, köt. 25, o. 821–852, 2007, doi: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141557.

[122] P. G. Fallon *és mtsai.*, „Identification of an interleukin (IL)-25-dependent cell population that provides IL-4, IL-5, and IL-13 at the onset of helminth expulsion”, *J. Exp. Med.*, köt. 203, sz. 4, o. 1105–1116, ápr. 2006, doi: 10.1084/jem.20051615.

[123] M. M. Fort *és mtsai.*, „IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo”, *Immunity*, köt. 15, sz. 6, o. 985–995, 0 2001.

[124] X. Zhou, Q. Chen, J. Moore, J. K. Kolls, S. Halperin, és J. Wang, „Critical role of the interleukin-17/interleukin-17 receptor axis in regulating host susceptibility to respiratory infection with Chlamydia species”, *Infect. Immun.*, köt. 77, sz. 11, o. 5059–5070, 0 2009, doi: 10.1128/IAI.00403-09.

[125] M. A. Kleinschek *és mtsai.*, „IL-23 enhances the inflammatory cell response in Cryptococcus neoformans infection and induces a cytokine pattern distinct from IL-12”, *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, köt. 176, sz. 2, o. 1098–1106, 0 2006.

[126] W. Huang, L. Na, P. L. Fidel, és P. Schwarzenberger, „Requirement of interleukin-17A for systemic anti-Candida albicans host defense in mice”, *J. Infect. Dis.*, köt. 190, sz. 3, o. 624–631, 0 2004, doi: 10.1086/422329.

[127] S. Romagnani, „Human Th17 cells”, *Arthritis Res. Ther.*, köt. 10, sz. 2, o. 206, 2008, doi: 10.1186/ar2392.

[128] D. Longbottom, „Chlamydial vaccine development”, *J. Med. Microbiol.*, köt. 52, sz. Pt 7, o. 537–540, júl. 2003.

[129] R. C. Brunham, D. J. Zhang, X. Yang, és G. M. McClarty, „The potential for vaccine development against chlamydial infection and disease”, *J. Infect. Dis.*, köt. 181 Suppl 3, o. S538-543, jún. 2000, doi: 10.1086/315630.

[130] A. J. Stagg, „Vaccines against Chlamydia: approaches and progress”, *Mol. Med. Today*, köt. 4, sz. 4, o. 166–173, ápr. 1998.

[131] P. E. Shewen, R. C. Povey, és M. R. Wilson, „A comparison of the efficacy of a live and four inactivated vaccine preparations for the protection of cats against experimental challenge with Chlamydia psittaci”, *Can. J. Comp. Med. Rev. Can. Médecine Comparée*, köt. 44, sz. 3, o. 244–251, júl. 1980.

[132] J. T. Grayston és S. P. Wang, „The potential for vaccine against infection of the genital tract with Chlamydia trachomatis”, *Sex. Transm. Dis.*, köt. 5, sz. 2, o. 73–77, jún. 1978.

[133] C. Olive, I. Toth, és D. Jackson, „Technological advances in antigen delivery and synthetic peptide vaccine developmental strategies”, *Mini Rev. Med. Chem.*, köt. 1, sz. 4, o. 429–438, 0 2001.

[134] S. Pal, I. Theodor, E. M. Peterson, és L. M. de la Maza, „Immunization with the Chlamydia trachomatis mouse pneumonitis major outer membrane protein can elicit a protective immune response against a genital challenge”, *Infect. Immun.*, köt. 69, sz. 10, o. 6240–6247, okt. 2001, doi: 10.1128/IAI.69.10.6240-6247.2001.

[135] J. E. Koehler, S. Birkelund, és R. S. Stephens, „Overexpression and surface localization of the Chlamydia trachomatis major outer membrane protein in Escherichia coli”, *Mol. Microbiol.*, köt. 6, sz. 9, o. 1087–1094, máj. 1992, doi: 10.1111/j.1365-2958.1992.tb01545.x.

[136] D. W. Andrew, L. M. Hafner, K. W. Beagley, és P. Timms, „Partial protection against chlamydial reproductive tract infection by a recombinant major outer membrane protein/CpG/cholera toxin intranasal vaccine in the guinea pig Chlamydia caviae model”, *J. Reprod. Immunol.*, köt. 91, sz. 1–2, o. 9–16, szept. 2011, doi: 10.1016/j.jri.2011.06.100.

[137] S. Pal, C. J. Luke, A. G. Barbour, E. M. Peterson, és L. M. de la Maza, „Immunization with the Chlamydia trachomatis major outer membrane protein, using the outer surface protein A of

Borrelia burgdorferi as an adjuvant, can induce protection against a chlamydial genital challenge”, *Vaccine*, köt. 21, sz. 13–14, o. 1455–1465, márc. 2003.

[138] G. Sun, S. Pal, J. Weiland, E. M. Peterson, és L. M. de la Maza, „Protection against an intranasal challenge by vaccines formulated with native and recombinant preparations of the Chlamydia trachomatis major outer membrane protein”, *Vaccine*, köt. 27, sz. 36, o. 5020–5025, 0 2009, doi: 10.1016/j.vaccine.2009.05.008.

[139] P. Ralli-Jain, D. Tifrea, C. Cheng, S. Pal, és L. M. de la Maza, „Enhancement of the protective efficacy of a Chlamydia trachomatis recombinant vaccine by combining systemic and mucosal routes for immunization”, *Vaccine*, köt. 28, sz. 48, o. 7659–7666, 0 2010, doi: 10.1016/j.vaccine.2010.09.040.

[140] A. K. Murthy, J. P. Chambers, P. A. Meier, G. Zhong, és B. P. Arulanandam, „Intranasal vaccination with a secreted chlamydial protein enhances resolution of genital Chlamydia muridarum infection, protects against oviduct pathology, and is highly dependent upon endogenous gamma interferon production”, *Infect. Immun.*, köt. 75, sz. 2, o. 666–676, febr. 2007, doi: 10.1128/IAI.01280-06.

[141] S. C. Knight, S. Iqball, C. Woods, A. Stagg, M. E. Ward, és M. Tuffrey, „A peptide of Chlamydia trachomatis shown to be a primary T-cell epitope in vitro induces cell-mediated immunity in vivo”, *Immunology*, köt. 85, sz. 1, o. 8–15, máj. 1995.

[142] H. Su, M. Parnell, és H. D. Caldwell, „Protective efficacy of a parenterally administered MOMP-derived synthetic oligopeptide vaccine in a murine model of Chlamydia trachomatis genital tract infection: serum neutralizing IgG antibodies do not protect against chlamydial genital tract infection”, *Vaccine*, köt. 13, sz. 11, o. 1023–1032, 0 1995.

[143] V. Endrész *és mtsai.*, „Optimization of DNA immunization against human cytomegalovirus”, *Vaccine*, köt. 19, sz. 28–29, o. 3972–3980, júl. 2001.

[144] T. Martin *és mtsai.*, „Plasmid DNA malaria vaccine: the potential for genomic integration after intramuscular injection”, *Hum. Gene Ther.*, köt. 10, sz. 5, o. 759–768, márc. 1999, doi: 10.1089/10430349950018517.

[145] L. A. Babiuk, R. Pontarollo, S. Babiuk, B. Loehr, és S. van Drunen Littel-van den Hurk, „Induction of immune responses by DNA vaccines in large animals”, *Vaccine*, köt. 21, sz. 7–8, o. 649–658, 0 2003.

[146] A. M. Watts és R. C. Kennedy, „DNA vaccination strategies against infectious diseases”, *Int. J. Parasitol.*, köt. 29, sz. 8, o. 1149–1163, 0 1999.

[147] S. Pal, K. M. Barnhart, Q. Wei, A. M. Abai, E. M. Peterson, és L. M. de la Maza, „Vaccination of mice with DNA plasmids coding for the Chlamydia trachomatis major outer membrane protein elicits an immune response but fails to protect against a genital challenge”, *Vaccine*, köt. 17, sz. 5, o. 459–465, febr. 1999.

[148] M. Donati *és mtsai.*, „DNA immunization with pgp3 gene of Chlamydia trachomatis inhibits the spread of chlamydial infection from the lower to the upper genital tract in C3H/HeN mice”, *Vaccine*, köt. 21, sz. 11–12, o. 1089–1093, márc. 2003.

[149] E. V. Koonin, K. S. Makarova, és L. Aravind, „Horizontal gene transfer in prokaryotes: quantification and classification”, *Annu. Rev. Microbiol.*, köt. 55, o. 709–742, 2001, doi: 10.1146/annurev.micro.55.1.709.

[150] N. S. Thomas, M. Lusher, C. C. Storey, és I. N. Clarke, „Plasmid diversity in Chlamydia”, *Microbiol. Read. Engl.*, köt. 143 (Pt 6), o. 1847–1854, jún. 1997.

[151] M. A. Pickett, J. S. Everson, P. J. Pead, és I. N. Clarke, „The plasmids of Chlamydia trachomatis and Chlamydophila pneumoniae (N16): accurate determination of copy number and the paradoxical effect of plasmid-curing agents”, *Microbiol. Read. Engl.*, köt. 151, sz. Pt 3, o. 893–903, márc. 2005, doi: 10.1099/mic.0.27625-0.

[152] A. Farencena, M. Comanducci, M. Donati, G. Ratti, és R. Cevenini, „Characterization of a new isolate of Chlamydia trachomatis which lacks the common plasmid and has properties of biovar trachoma”, *Infect. Immun.*, köt. 65, sz. 7, o. 2965–2969, júl. 1997.

[153] Q. An *és mtsai.*, „Infection with a plasmid-free variant Chlamydia related to Chlamydia trachomatis identified by using multiple assays for nucleic acid detection”, *J. Clin. Microbiol.*, köt. 30, sz. 11, o. 2814–2821, 0 1992.

[154] C. C. Storey, M. Lusher, és S. J. Richmond, „Analysis of the complete nucleotide sequence of Chp1, a phage which infects avian Chlamydia psittaci”, *J. Gen. Virol.*, köt. 70 (Pt 12), o. 3381–3390, 0 1989.

[155] H. M. B. Seth-Smith *és mtsai.*, „Co-evolution of genomes and plasmids within Chlamydia trachomatis and the emergence in Sweden of a new variant strain”, *BMC Genomics*, köt. 10, o. 239, 2009, doi: 10.1186/1471-2164-10-239.

[156] H. Fredlund, L. Falk, M. Jurstrand, és M. Unemo, „Molecular genetic methods for diagnosis and characterisation of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae: impact on epidemiological surveillance and interventions”, *APMIS Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.*, köt. 112, sz. 11–12, o. 771–784, dec. 2004, doi: 10.1111/j.1600-0463.2004.apm11211-1205.x.

[157] M. Unemo és I. N. Clarke, „The Swedish new variant of Chlamydia trachomatis”, *Curr. Opin. Infect. Dis.*, köt. 24, sz. 1, o. 62–69, febr. 2011, doi: 10.1097/QCO.0b013e32834204d5.

[158] A. Matsumoto, H. Izutsu, N. Miyashita, és M. Ohuchi, „Plaque formation by and plaque cloning of Chlamydia trachomatis biovar trachoma”, *J. Clin. Microbiol.*, köt. 36, sz. 10, o. 3013–3019, okt. 1998.

[159] C. M. O’Connell és K. M. Nicks, „A plasmid-cured Chlamydia muridarum strain displays altered plaque morphology and reduced infectivity in cell culture”, *Microbiol. Read. Engl.*, köt. 152, sz. Pt 6, o. 1601–1607, jún. 2006, doi: 10.1099/mic.0.28658-0.

[160] J. H. Carlson *és mtsai.*, „The Chlamydia trachomatis plasmid is a transcriptional regulator of chromosomal genes and a virulence factor”, *Infect. Immun.*, köt. 76, sz. 6, o. 2273–2283, jún. 2008, doi: 10.1128/IAI.00102-08.

[161] C. M. O’Connell *és mtsai.*, „Toll-like receptor 2 activation by Chlamydia trachomatis is plasmid dependent, and plasmid-responsive chromosomal loci are coordinately regulated in response to glucose limitation by C. trachomatis but not by C. muridarum”, *Infect. Immun.*, köt. 79, sz. 3, o. 1044–1056, márc. 2011, doi: 10.1128/IAI.01118-10.

[162] M. Comanducci *és mtsai.*, „Humoral immune response to plasmid protein pgp3 in patients with Chlamydia trachomatis infection”, *Infect. Immun.*, köt. 62, sz. 12, o. 5491–5497, 0 1994.

[163] Z. Li, D. Chen, Y. Zhong, S. Wang, és G. Zhong, „The chlamydial plasmid-encoded protein pgp3 is secreted into the cytosol of Chlamydia-infected cells”, *Infect. Immun.*, köt. 76, sz. 8, o. 3415–3428, 0 2008, doi: 10.1128/IAI.01377-07.

[164] L. Song *és mtsai.*, „Chlamydia trachomatis plasmid-encoded Pgp4 is a transcriptional regulator of virulence-associated genes”, *Infect. Immun.*, köt. 81, sz. 3, o. 636–644, márc. 2013, doi: 10.1128/IAI.01305-12.

[165] S. A. Wang, J. R. Papp, W. E. Stamm, R. W. Peeling, D. H. Martin, és K. K. Holmes, „Evaluation of antimicrobial resistance and treatment failures for Chlamydia trachomatis: a meeting report”, *J. Infect. Dis.*, köt. 191, sz. 6, o. 917–923, márc. 2005, doi: 10.1086/428290.

[166] M. R. Hammerschlag, „The intracellular life of chlamydiae”, *Semin. Pediatr. Infect. Dis.*, köt. 13, sz. 4, o. 239–248, okt. 2002, doi: 10.1053/spid.2002.127201.

[167] R. J. Skilton *és mtsai.*, „Penicillin induced persistence in Chlamydia trachomatis: high quality time lapse video analysis of the developmental cycle”, *PloS One*, köt. 4, sz. 11, o. e7723, 2009, doi: 10.1371/journal.pone.0007723.

[168] P. R. Lambden, M. A. Pickett, és I. N. Clarke, „The effect of penicillin on Chlamydia trachomatis DNA replication”, *Microbiol. Read. Engl.*, köt. 152, sz. Pt 9, o. 2573–2578, szept. 2006, doi: 10.1099/mic.0.29032-0.

[169] K. A. Cunningham, A. J. Carey, L. Hafner, P. Timms, és K. W. Beagley, „Chlamydia muridarum major outer membrane protein-specific antibodies inhibit in vitro infection but enhance pathology in vivo”, *Am. J. Reprod. Immunol. N. Y. N 1989*, köt. 65, sz. 2, o. 118–126, febr. 2011, doi: 10.1111/j.1600-0897.2010.00894.x.

[170] C. van Ooij *és mtsai.*, „Host cell-derived sphingolipids are required for the intracellular growth of Chlamydia trachomatis”, *Cell. Microbiol.*, köt. 2, sz. 6, o. 627–637, 0 2000.

[171] D. S. Meyers, H. Halvorson, S. Luckhaupt, és U.S. Preventive Services Task Force, „Screening for chlamydial infection: an evidence update for the U.S. Preventive Services Task Force”, *Ann. Intern. Med.*, köt. 147, sz. 2, o. 135–142, júl. 2007.

[172] M. C. Roberts, „Tetracycline therapy: update”, *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.*, köt. 36, sz. 4, o. 462–467, febr. 2003, doi: 10.1086/367622.

[173] C.-Y. Lau és A. K. Qureshi, „Azithromycin versus doxycycline for genital chlamydial infections: a meta-analysis of randomized clinical trials”, *Sex. Transm. Dis.*, köt. 29, sz. 9, o. 497–502, szept. 2002.

[174] P. Horner, „Chlamydia (uncomplicated, genital)”, *Clin. Evid.*, köt. 2010, 2010.

[175] V. Mokhtari, P. Afsharian, M. Shahhoseini, S. M. Kalantar, és A. Moini, „A Review on Various Uses of N-Acetyl Cysteine”, *Cell J.*, köt. 19, sz. 1, o. 11–17, jún. 2017, doi: 10.22074/cellj.2016.4872.

[176] K. M. Beeh, J. Beier, A. Esperester, és L. D. Paul, „Antiinflammatory properties of ambroxol”, *Eur. J. Med. Res.*, köt. 13, sz. 12, o. 557–562, 0 2008.

[177] J. B. Morjaria, A. Rigby, és A. H. Morice, „Inhaled Corticosteroid use and the Risk of Pneumonia and COPD Exacerbations in the UPLIFT Study”, *Lung*, köt. 195, sz. 3, o. 281–288, jún. 2017, doi: 10.1007/s00408-017-9990-8.

[178] D. D. Sin *és mtsai.*, „Budesonide and the risk of pneumonia: a meta-analysis of individual patient data”, *Lancet Lond. Engl.*, köt. 374, sz. 9691, o. 712–719, aug. 2009, doi: 10.1016/S0140-6736(09)61250-2.

[179] A. Aiyar *és mtsai.*, „Influence of the tryptophan-indole-IFNγ axis on human genital Chlamydia trachomatis infection: role of vaginal co-infections”, *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, köt. 4, o. 72, 2014, doi: 10.3389/fcimb.2014.00072.

[180] A. Mahalingam *és mtsai.*, „Vaginal microbicide gel for delivery of IQP-0528, a pyrimidinedione analog with a dual mechanism of action against HIV-1”, *Antimicrob. Agents Chemother.*, köt. 55, sz. 4, o. 1650–1660, ápr. 2011, doi: 10.1128/AAC.01368-10.

[181] H. L. Fulkerson, M. T. Nogalski, D. Collins-McMillen, és A. D. Yurochko, „Overview of Human Cytomegalovirus Pathogenesis”, *Methods Mol. Biol. Clifton NJ*, köt. 2244, o. 1–18, 2021, doi: 10.1007/978-1-0716-1111-1_1.

[182] S. Scarpini, F. Morigi, L. Betti, A. Dondi, C. Biagi, és M. Lanari, „Development of a Vaccine against Human Cytomegalovirus: Advances, Barriers, and Implications for the Clinical Practice”, *Vaccines*, köt. 9, sz. 6, o. 551, máj. 2021, doi: 10.3390/vaccines9060551.

[183] T. Penttilä, E. Wahlström, J. M. Vuola, M. Sarvas, és M. Puolakkainen, „Systemic and mucosal antibody response in experimental Chlamydia pneumoniae infection of mice”, *Comp. Med.*, köt. 56, sz. 4, o. 272–278, aug. 2006.

[184] EDQM Council of Europe, *European Pharmacopoeia (Ph. Eur.)*, 9th kiad. Strasbourg, Franciaország, 2017.

[185] D. H. Owen és D. F. Katz, „A vaginal fluid simulant”, *Contraception*, köt. 59, sz. 2, o. 91–95, febr. 1999, doi: 10.1016/s0010-7824(99)00010-4.

[186] I. Eszik *és mtsai.*, „High dynamic range detection of Chlamydia trachomatis growth by direct quantitative PCR of the infected cells”, *J. Microbiol. Methods*, köt. 120, o. 15–22, 0 2016, doi: 10.1016/j.mimet.2015.11.010.

[187] A. Bogdanov *és mtsai.*, „Application of DNA chip scanning technology for automatic detection of Chlamydia trachomatis and Chlamydia pneumoniae inclusions”, *Antimicrob. Agents Chemother.*, köt. 58, sz. 1, o. 405–413, 2014, doi: 10.1128/AAC.01400-13.

[188] N. M. Rothstein, T. C. Quinn, G. Madico, C. A. Gaydos, és C. J. Lowenstein, „Effect of azithromycin on murine arteriosclerosis exacerbated by Chlamydia pneumoniae”, *J. Infect. Dis.*, köt. 183, sz. 2, o. 232–238, 0 2001, doi: 10.1086/317941.

[189] L. Erkkilä *és mtsai.*, „Heat shock protein 60 autoimmunity and early lipid lesions in cholesterol-fed C57BL/6JBom mice during Chlamydia pneumoniae infection”, *Atherosclerosis*, köt. 177, sz. 2, o. 321–328, 0 2004, doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2004.08.021.

[190] M. Zuśka-Prot és T. Maślanka, „Effect of inhaled and systemic glucocorticoid treatment on CD4+ regulatory and effector T cells in a mouse model of allergic asthma”, *Int. Immunopharmacol.*, köt. 45, o. 98–109, ápr. 2017, doi: 10.1016/j.intimp.2017.02.005.

[191] D. Jaffuel *és mtsai.*, „Transcriptional potencies of inhaled glucocorticoids”, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, köt. 162, sz. 1, o. 57–63, júl. 2000, doi: 10.1164/ajrccm.162.1.9901006.

[192] A. B. Becker és E. M. Abrams, „Asthma guidelines: the Global Initiative for Asthma in relation to national guidelines”, *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, köt. 17, sz. 2, o. 99–103, ápr. 2017, doi: 10.1097/ACI.0000000000000346.

[193] C. Hervé, P. Beyne, H. Jamault, és E. Delacoux, „Determination of tryptophan and its kynurenine pathway metabolites in human serum by high-performance liquid chromatography with simultaneous ultraviolet and fluorimetric detection”, *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.*, köt. 675, sz. 1, o. 157–161, 0 1996, doi: 10.1016/0378-4347(95)00341-x.

[194] G. Veres *és mtsai.*, „Central nervous system-specific alterations in the tryptophan metabolism in the 3-nitropropionic acid model of Huntington’s disease”, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, köt. 132, o. 115–124, 2015, doi: 10.1016/j.pbb.2015.03.002.

[195] B. Paigen, A. Morrow, P. A. Holmes, D. Mitchell, és R. A. Williams, „Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice”, *Atherosclerosis*, köt. 68, sz. 3, o. 231–240, 0 1987, doi: 10.1016/0021-9150(87)90202-4.

[196] K. Höner Zu Bentrup, A. Miczak, D. L. Swenson, és D. G. Russell, „Characterization of activity and expression of isocitrate lyase in Mycobacterium avium and Mycobacterium tuberculosis”, *J. Bacteriol.*, köt. 181, sz. 23, o. 7161–7167, 0 1999.

[197] S. Tabor és C. C. Richardson, „A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. 1985”, *Biotechnol. Read. Mass*, köt. 24, o. 280–284, 1992.

[198] J. M. Penttilä *és mtsai.*, „Local immune responses to Chlamydia pneumoniae in the lungs of BALB/c mice during primary infection and reinfection”, *Infect. Immun.*, köt. 66, sz. 11, o. 5113–5118, 0 1998.

[199] E. Gonczol, G. Furlini, J. Ianacone, és S. A. Plotkin, „A rapid microneutralization assay for cytomegalovirus”, *J. Virol. Methods*, köt. 14, sz. 1, o. 37–41, 0 1986, doi: 10.1016/0166-0934(86)90005-4.

[200] K. Berencsi, R. F. Rando, C. deTaisne, E. Paoletti, S. A. Plotkin, és E. Gonczol, „Murine cytotoxic T cell response specific for human cytomegalovirus glycoprotein B (gB) induced by adenovirus and vaccinia virus recombinants expressing gB”, *J. Gen. Virol.*, köt. 74 (Pt 11), o. 2507–2512, 0 1993, doi: 10.1099/0022-1317-74-11-2507.

[201] V. Borges, R. Ferreira, A. Nunes, P. Nogueira, M. J. Borrego, és J. P. Gomes, „Normalization strategies for real-time expression data in Chlamydia trachomatis”, *J. Microbiol. Methods*, köt. 82, sz. 3, o. 256–264, szept. 2010, doi: 10.1016/j.mimet.2010.06.013.

[202] L. Mannonen, E. Kamping, T. Penttilä, és M. Puolakkainen, „IFN-gamma induced persistent Chlamydia pneumoniae infection in HL and Mono Mac 6 cells: characterization by real-time quantitative PCR and culture”, *Microb. Pathog.*, köt. 36, sz. 1, o. 41–50, 0 2004, doi: 10.1016/j.micpath.2003.09.001.

[203] T. Mosolygó *és mtsai.*, „Chlamydophila pneumoniae re-infection triggers the production of IL-17A and IL-17E, important regulators of airway inflammation”, *Inflamm. Res. Off. J. Eur. Histamine Res. Soc. Al*, köt. 62, sz. 5, o. 451–460, máj. 2013, doi: 10.1007/s00011-013-0596-1.
[204] S. Dhanasekaran, T. M. Doherty, J. Kenneth, és TB Trials Study Group, „Comparison of different standards for real-time PCR-based absolute quantification”, *J. Immunol. Methods*, köt. 354, sz. 1–2, o. 34–39, márc. 2010, doi: 10.1016/j.jim.2010.01.004.
[205] C. Y. Tong és M. Sillis, „Detection of Chlamydia pneumoniae and Chlamydia psittaci in sputum samples by PCR”, *J. Clin. Pathol.*, köt. 46, sz. 4, o. 313–317, ápr. 1993, doi: 10.1136/jcp.46.4.313.
[206] R. Santamaría és P. Pierre, „Voronto: mapper for expression data to ontologies”, *Bioinforma. Oxf. Engl.*, köt. 28, sz. 17, o. 2281–2282, szept. 2012, doi: 10.1093/bioinformatics/bts428.
[207] J. S. Yuan, A. Reed, F. Chen, és C. N. Stewart, „Statistical analysis of real-time PCR data”, *BMC Bioinformatics*, köt. 7, o. 85, febr. 2006, doi: 10.1186/1471-2105-7-85.
[208] D. Rajagopalan, „A comparison of statistical methods for analysis of high density oligonucleotide array data”, *Bioinforma. Oxf. Engl.*, köt. 19, sz. 12, o. 1469–1476, 0 2003.
[209] A. Sturn, J. Quackenbush, és Z. Trajanoski, „Genesis: cluster analysis of microarray data”, *Bioinforma. Oxf. Engl.*, köt. 18, sz. 1, o. 207–208, 0 2002.
[210] B. T. Sherman *és mtsai.*, „DAVID Knowledgebase: a gene-centered database integrating heterogeneous gene annotation resources to facilitate high-throughput gene functional analysis”, *BMC Bioinformatics*, köt. 8, o. 426, 2007, doi: 10.1186/1471-2105-8-426.
[211] L. J. Jensen *és mtsai.*, „STRING 8--a global view on proteins and their functional interactions in 630 organisms”, *Nucleic Acids Res.*, köt. 37, sz. Database issue, o. D412-416, 0 2009, doi: 10.1093/nar/gkn760.
[212] S. L. Johnston és R. J. Martin, „Chlamydophila pneumoniae and Mycoplasma pneumoniae: a role in asthma pathogenesis?”, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, köt. 172, sz. 9, o. 1078–1089, 0 2005, doi: 10.1164/rccm.200412-1743PP.
[213] P. Angkasekwinai *és mtsai.*, „Interleukin 25 promotes the initiation of proallergic type 2 responses”, *J. Exp. Med.*, köt. 204, sz. 7, o. 1509–1517, júl. 2007, doi: 10.1084/jem.20061675.
[214] Z. Kis *és mtsai.*, „Inflammatory- and immune responses in relation to bacterial replication in mice following re-infections with Chlamydophila pneumoniae”, *Inflamm. Res. Off. J. Eur. Histamine Res. Soc. Al*, köt. 57, sz. 6, o. 287–295, jún. 2008, doi: 10.1007/s00011-007-7124-0.
[215] H. Bai *és mtsai.*, „IL-17/Th17 promotes type 1 T cell immunity against pulmonary intracellular bacterial infection through modulating dendritic cell function”, *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, köt. 183, sz. 9, o. 5886–5895, 0 2009, doi: 10.4049/jimmunol.0901584.
[216] X. Zhang *és mtsai.*, „A MyD88-dependent early IL-17 production protects mice against airway infection with the obligate intracellular pathogen Chlamydia muridarum”, *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, köt. 183, sz. 2, o. 1291–1300, júl. 2009, doi: 10.4049/jimmunol.0803075.
[217] S. A. Khader *és mtsai.*, „IL-23 compensates for the absence of IL-12p70 and is essential for the IL-17 response during tuberculosis but is dispensable for protection and antigen-specific IFN-gamma responses if IL-12p70 is available”, *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, köt. 175, sz. 2, o. 788–795, júl. 2005.
[218] Y. Okamoto Yoshida *és mtsai.*, „Essential role of IL-17A in the formation of a mycobacterial infection-induced granuloma in the lung”, *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, köt. 184, sz. 8, o. 4414–4422, ápr. 2010, doi: 10.4049/jimmunol.0903332.
[219] S. M. Schulz *és mtsai.*, „Protective immunity to systemic infection with attenuated Salmonella enterica serovar enteritidis in the absence of IL-12 is associated with IL-23-dependent IL-22, but not IL-17”, *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, köt. 181, sz. 11, o. 7891–7901, 0 2008.
[220] M. Raffatellu *és mtsai.*, „Simian immunodeficiency virus-induced mucosal interleukin-17 deficiency promotes Salmonella dissemination from the gut”, *Nat. Med.*, köt. 14, sz. 4, o. 421–428, ápr. 2008, doi: 10.1038/nm1743.

[221] S. Hamada *és mtsai.*, „IL-17A produced by gammadelta T cells plays a critical role in innate immunity against listeria monocytogenes infection in the liver”, *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, köt. 181, sz. 5, o. 3456–3463, szept. 2008.
[222] E. Lockhart, A. M. Green, és J. L. Flynn, „IL-17 production is dominated by gammadelta T cells rather than CD4 T cells during Mycobacterium tuberculosis infection”, *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, köt. 177, sz. 7, o. 4662–4669, okt. 2006.
[223] D. J. Cua és C. M. Tato, „Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system”, *Nat. Rev. Immunol.*, köt. 10, sz. 7, o. 479–489, júl. 2010, doi: 10.1038/nri2800.
[224] K. I. Happel *és mtsai.*, „Divergent roles of IL-23 and IL-12 in host defense against Klebsiella pneumoniae”, *J. Exp. Med.*, köt. 202, sz. 6, o. 761–769, szept. 2005, doi: 10.1084/jem.20050193.
[225] R. P. Morrison, „Chlamydial hsp60 and the immunopathogenesis of chlamydial disease”, *Semin. Immunol.*, köt. 3, sz. 1, o. 25–33, 0 1991.
[226] S. S. Kaukoranta-Tolvanen, A. L. Laurila, P. Saikku, M. Leinonen, L. Liesirova, és K. Laitinen, „Experimental infection of Chlamydia pneumoniae in mice”, *Microb. Pathog.*, köt. 15, sz. 4, o. 293–302, okt. 1993, doi: 10.1006/mpat.1993.1079.
[227] M. Suzukawa *és mtsai.*, „Epithelial cell-derived IL-25, but not Th17 cell-derived IL-17 or IL-17F, is crucial for murine asthma”, *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, köt. 189, sz. 7, o. 3641–3652, okt. 2012, doi: 10.4049/jimmunol.1200461.
[228] T. C. Moazed, C. C. Kuo, J. T. Grayston, és L. A. Campbell, „Evidence of systemic dissemination of Chlamydia pneumoniae via macrophages in the mouse”, *J. Infect. Dis.*, köt. 177, sz. 5, o. 1322–1325, máj. 1998.
[229] T. Mygind, B. Vandahl, A. S. Pedersen, G. Christiansen, P. Höllsberg, és S. Birkelund, „Identification of an in vivo CD4+ T cell-mediated response to polymorphic membrane proteins of Chlamydia pneumoniae during experimental infection”, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, köt. 40, sz. 2, o. 129–137, márc. 2004, doi: 10.1016/S0928-8244(03)00300-6.
[230] M. Paldanius, A. Bloigu, M. Alho, M. Leinonen, és P. Saikku, „Prevalence and persistence of Chlamydia pneumoniae antibodies in healthy laboratory personnel in Finland”, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, köt. 12, sz. 5, o. 654–659, máj. 2005, doi: 10.1128/CDLI.12.5.654-659.2005.
[231] X. X. Bin, K. Wolf, T. Schaffner, és R. Malinverni, „Effect of azithromycin plus rifampin versus amoxicillin alone on eradication and inflammation in the chronic course of Chlamydia pneumoniae pneumonitis in mice”, *Antimicrob. Agents Chemother.*, köt. 44, sz. 6, o. 1761–1764, jún. 2000.
[232] L. A. Campbell, T. Nosaka, M. E. Rosenfeld, K. Yaraei, és C.-C. Kuo, „Tumor necrosis factor alpha plays a role in the acceleration of atherosclerosis by Chlamydia pneumoniae in mice”, *Infect. Immun.*, köt. 73, sz. 5, o. 3164–3165, máj. 2005, doi: 10.1128/IAI.73.5.3164-3165.2005.
[233] Z. P. Yang, P. K. Cummings, D. L. Patton, és C. C. Kuo, „Ultrastructural lung pathology of experimental Chlamydia pneumoniae pneumonitis in mice”, *J. Infect. Dis.*, köt. 170, sz. 2, o. 464–467, 0 1994.
[234] S. E. Kaukoranta-Tolvanen, A. L. Laurila, P. Saikku, M. Leinonen, és K. Laitinen, „Experimental Chlamydia pneumoniae infection in mice: effect of reinfection and passive immunization”, *Microb. Pathog.*, köt. 18, sz. 4, o. 279–288, ápr. 1995.
[235] D. H. Thom, J. T. Grayston, L. A. Campbell, C. C. Kuo, V. K. Diwan, és S. P. Wang, „Respiratory infection with Chlamydia pneumoniae in middle-aged and older adult outpatients”, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.*, köt. 13, sz. 10, o. 785–792, okt. 1994.
[236] T. M. File és J. S. Tan, „Chlamydia pneumoniae pneumonia”, *Semin. Respir. Crit. Care Med.*, köt. 21, sz. 4, o. 285–294, 2000, doi: 10.1055/s-2000-9857.
[237] T. C. Moazed, C. Kuo, J. T. Grayston, és L. A. Campbell, „Murine models of Chlamydia pneumoniae infection and atherosclerosis”, *J. Infect. Dis.*, köt. 175, sz. 4, o. 883–890, ápr. 1997.
[238] Z. P. Yang, C. C. Kuo, és J. T. Grayston, „A mouse model of Chlamydia pneumoniae strain TWAR pneumonitis”, *Infect. Immun.*, köt. 61, sz. 5, o. 2037–2040, máj. 1993.

[239] R. Monno *és mtsai.*, „Chlamydia pneumoniae in community-acquired pneumonia: seven years of experience”, *J. Infect.*, köt. 45, sz. 3, o. 135–138, okt. 2002.
[240] G. Falck, J. Gnarpe, L.-O. Hansson, K. Svärdsudd, és H. Gnarpe, „Comparison of individuals with and without specific IgA antibodies to Chlamydia pneumoniae: respiratory morbidity and the metabolic syndrome”, *Chest*, köt. 122, sz. 5, o. 1587–1593, 0 2002.
[241] A. Anzini *és mtsai.*, „Chlamydia pneumoniae infection in young stroke patients: a case--control study”, *Eur. J. Neurol. Off. J. Eur. Fed. Neurol. Soc.*, köt. 11, sz. 5, o. 321–327, máj. 2004, doi: 10.1111/j.1468-1331.2004.00775.x.
[242] R. LaBiche *és mtsai.*, „Presence of Chlamydia pneumoniae in human symptomatic and asymptomatic carotid atherosclerotic plaque”, *Stroke J. Cereb. Circ.*, köt. 32, sz. 4, o. 855–860, ápr. 2001.
[243] L. von Hertzen, M. Leinonen, H. M. Surcel, J. Karjalainen, és P. Saikku, „Measurement of sputum antibodies in the diagnosis of acute and chronic respiratory infections associated with Chlamydia pneumoniae”, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, köt. 2, sz. 4, o. 454–457, júl. 1995.
[244] „Global stage-specific gene regulation during the developmental cycle of Chlamydia trachomatis. - PubMed - NCBI”. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Nicholson+TL%2C+Olinger+L%2C+Chong+K (elérés jan. 07, 2020).
[245] „Viability and gene expression in Chlamydia trachomatis during persistent infection of cultured human monocytes. - PubMed - NCBI”. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=G%C3%A9rard+HC%2C+K%C3%B6hler+L%2C+Branigan+PJ (elérés jan. 07, 2020).
[246] „The transcriptional repressor EUO regulates both subsets of Chlamydia late genes. - PubMed - NCBI”. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Rosario+CJ%2C+Hanson+BR%2C+Tan+M (elérés jan. 07, 2020).
[247] „The early gene product EUO is a transcriptional repressor that selectively regulates promoters of Chlamydia late genes. - PubMed - NCBI”. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22624851 (elérés jan. 07, 2020).
[248] „Differential expression of three Chlamydia trachomatis hsp60-encoding genes in active vs. persistent infections. - PubMed - NCBI”. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14643638 (elérés jan. 07, 2020).
[249] „The Role of the Immune Response in Chlamydia trachomatis Infection of the Male Genital Tract: A Double-Edged Sword. - PubMed - NCBI”. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25386180 (elérés jan. 07, 2020).
[250] „Functions of Cationic Host Defense Peptides in Immunity. - PubMed - NCBI”. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27384571 (elérés jan. 07, 2020).
[251] „Human beta-defensin-2 functions as a chemotactic agent for tumour necrosis factor-alpha-treated human neutrophils. - PubMed - NCBI”. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15009427 (elérés jan. 07, 2020).
[252] D. Yang *és mtsai.*, „Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6”, *Science*, köt. 286, sz. 5439, o. 525–528, okt. 1999.
[253] „Cervicovaginal Levels of Human β-Defensin 1, 2, 3, and 4 of Reproductive-Aged Women With Chlamydia trachomatis Infection. - PubMed - NCBI”. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Noda-Nicolau+NM%2C+Bastos+LB%2C+Bolpetti+AN (elérés jan. 07, 2020).
[254] „Inflammation and clearance of Chlamydia trachomatis in enteric and nonenteric mucosae. - PubMed - NCBI”. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Igietseme+JU%2C+Portis+JL%2C+Perry+LL (elérés jan. 07, 2020).

[255] „High co-occurrence of anorectal chlamydia with urogenital chlamydia in women visiting an STI clinic revealed by routine universal testing in an obs... - PubMed - NCBI”. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=High+co-occurrence+of+anorectal+chlamydia+with+urogenital+chlamydia+in+women+visiting+an+STI+clinic+revealed (elérés jan. 07, 2020).

[256] „Analyses of multiple-site and concurrent Chlamydia trachomatis serovar infections, and serovar tissue tropism for urogenital versus rectal specimen... - PubMed - NCBI”. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21856696 (elérés jan. 07, 2020).

[257] P. U. Heuschmann *és mtsai.*, „Association between infection with Helicobacter pylori and Chlamydia pneumoniae and risk of ischemic stroke subtypes: Results from a population-based case-control study”, *Stroke*, köt. 32, sz. 10, o. 2253–2258, okt. 2001, doi: 10.1161/hs1001.097096.

[258] S. S. Kaukoranta-Tolvanen, T. Ronni, M. Leinonen, P. Saikku, és K. Laitinen, „Expression of adhesion molecules on endothelial cells stimulated by Chlamydia pneumoniae”, *Microb. Pathog.*, köt. 21, sz. 5, o. 407–411, nov. 1996, doi: 10.1006/mpat.1996.0071.

[259] R. H. Fryer, E. P. Schwobe, M. L. Woods, és G. M. Rodgers, „Chlamydia species infect human vascular endothelial cells and induce procoagulant activity”, *J. Investig. Med. Off. Publ. Am. Fed. Clin. Res.*, köt. 45, sz. 4, o. 168–174, ápr. 1997.

[260] M. Heinemann, M. Susa, U. Simnacher, R. Marre, és A. Essig, „Growth of Chlamydia pneumoniae induces cytokine production and expression of CD14 in a human monocytic cell line”, *Infect. Immun.*, köt. 64, sz. 11, o. 4872–4875, nov. 1996, doi: 10.1128/iai.64.11.4872-4875.1996.

[261] L. A. Campbell, C. C. Kuo, és J. T. Grayston, „Chlamydia pneumoniae and cardiovascular disease”, *Emerg. Infect. Dis.*, köt. 4, sz. 4, o. 571–579, dec. 1998, doi: 10.3201/eid0404.980407.

[262] R. Sorrentino *és mtsai.*, „A single infection with Chlamydia pneumoniae is sufficient to exacerbate atherosclerosis in ApoE deficient mice”, *Cell. Immunol.*, köt. 294, sz. 1, o. 25–32, márc. 2015, doi: 10.1016/j.cellimm.2015.01.007.

[263] D. Nazzal *és mtsai.*, „Apolipoprotein E-deficient mice develop an anti-Chlamydophila pneumoniae T helper 2 response and resist vascular infection”, *J. Infect. Dis.*, köt. 202, sz. 5, o. 782–790, szept. 2010, doi: 10.1086/655700.

[264] Y. Naiki *és mtsai.*, „TLR/MyD88 and liver X receptor alpha signaling pathways reciprocally control Chlamydia pneumoniae-induced acceleration of atherosclerosis”, *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, köt. 181, sz. 10, o. 7176–7185, 0 2008, doi: 10.4049/jimmunol.181.10.7176.

[265] L. A. Campbell, T. C. Moazed, C.-C. Kuo, és J. T. Grayston, „Preclinical models for Chlamydia pneumoniae and cardiovascular disease: hypercholesterolemic mice”, *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, köt. 4 Suppl 4, o. S23–S32, 0 1998.

[266] L. A. Campbell és M. E. Rosenfeld, „Persistent C. pneumoniae infection in atherosclerotic lesions: rethinking the clinical trials”, *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, köt. 4, o. 34, 2014, doi: 10.3389/fcimb.2014.00034.

[267] K. Hyvärinen *és mtsai.*, „The effect of proatherogenic pathogens on adipose tissue transcriptome and fatty acid distribution in apolipoprotein E-deficient mice”, *BMC Genomics*, köt. 14, o. 709, okt. 2013, doi: 10.1186/1471-2164-14-709.

[268] A. Marangoni *és mtsai.*, „Chlamydia pneumoniae acute liver infection affects hepatic cholesterol and triglyceride metabolism in mice”, *Atherosclerosis*, köt. 241, sz. 2, o. 471–479, 0 2015, doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.05.023.

[269] A. M. Tuomainen *és mtsai.*, „The effect of proatherogenic microbes on macrophage cholesterol homeostasis in apoE-deficient mice”, *Microb. Pathog.*, köt. 51, sz. 3, o. 217–224, szept. 2011, doi: 10.1016/j.micpath.2011.03.003.

[270] M. Van Oosten *és mtsai.*, „Apolipoprotein E protects against bacterial lipopolysaccharide-induced lethality. A new therapeutic approach to treat gram-negative sepsis”, *J. Biol. Chem.*, köt. 276, sz. 12, o. 8820–8824, márc. 2001, doi: 10.1074/jbc.M009915200.
[271] W. Khovidhunkit *és mtsai.*, „Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: mechanisms and consequences to the host”, *J. Lipid Res.*, köt. 45, sz. 7, o. 1169–1196, júl. 2004, doi: 10.1194/jlr.R300019-JLR200.
[272] K. R. Feingold *és mtsai.*, „Effect of endotoxin on cholesterol biosynthesis and distribution in serum lipoproteins in Syrian hamsters”, *J. Lipid Res.*, köt. 34, sz. 12, o. 2147–2158, 0 1993.
[273] K. Kontula, A. Vuorio, H. Turtola, és P. Saikku, „Association of seropositivity for Chlamydia pneumoniae and coronary artery disease in heterozygous familial hypercholesterolaemia”, *Lancet Lond. Engl.*, köt. 354, sz. 9172, o. 46–47, júl. 1999, doi: 10.1016/S0140-6736(99)01691-8.
[274] J. Dobó, V. Harmat, L. Beinrohr, E. Sebestyén, P. Závodszky, és P. Gál, „MASP-1, a promiscuous complement protease: structure of its catalytic region reveals the basis of its broad specificity”, *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, köt. 183, sz. 2, o. 1207–1214, júl. 2009, doi: 10.4049/jimmunol.0901141.
[275] M. Ashburner *és mtsai.*, „Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium”, *Nat. Genet.*, köt. 25, sz. 1, o. 25–29, máj. 2000, doi: 10.1038/75556.
[276] D. P. Virok, D. E. Nelson, W. M. Whitmire, D. D. Crane, M. M. Goheen, és H. D. Caldwell, „Chlamydial infection induces pathobiotype-specific protein tyrosine phosphorylation in epithelial cells”, *Infect. Immun.*, köt. 73, sz. 4, o. 1939–1946, ápr. 2005, doi: 10.1128/IAI.73.4.1939-1946.2005.
[277] B. Beutler, K. Hoebe, és L. Shamel, „Forward genetic dissection of afferent immunity: the role of TIR adapter proteins in innate and adaptive immune responses”, *C. R. Biol.*, köt. 327, sz. 6, o. 571–580, jún. 2004.
[278] S. Prebeck *és mtsai.*, „Predominant role of toll-like receptor 2 versus 4 in Chlamydia pneumoniae-induced activation of dendritic cells”, *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, köt. 167, sz. 6, o. 3316–3323, szept. 2001.
[279] C. M. O’Connell, I. A. Ionova, A. J. Quayle, A. Visintin, és R. R. Ingalls, „Localization of TLR2 and MyD88 to Chlamydia trachomatis inclusions. Evidence for signaling by intracellular TLR2 during infection with an obligate intracellular pathogen”, *J. Biol. Chem.*, köt. 281, sz. 3, o. 1652–1659, 0 2006, doi: 10.1074/jbc.M510182200.
[280] D. Prantner, T. Darville, és U. M. Nagarajan, „Stimulator of IFN gene is critical for induction of IFN-beta during Chlamydia muridarum infection”, *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, köt. 184, sz. 5, o. 2551–2560, márc. 2010, doi: 10.4049/jimmunol.0903704.
[281] J. Lippmann *és mtsai.*, „IFNbeta responses induced by intracellular bacteria or cytosolic DNA in different human cells do not require ZBP1 (DLM-1/DAI)”, *Cell. Microbiol.*, köt. 10, sz. 12, o. 2579–2588, 0 2008, doi: 10.1111/j.1462-5822.2008.01232.x.
[282] A. Takaoka *és mtsai.*, „DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response”, *Nature*, köt. 448, sz. 7152, o. 501–505, júl. 2007, doi: 10.1038/nature06013.
[283] Y. K. Yee, S. R. Chintalacharuvu, J. Lu, és S. Nagpal, „Vitamin D receptor modulators for inflammation and cancer”, *Mini Rev. Med. Chem.*, köt. 5, sz. 8, o. 761–778, 0 2005.
[284] T. J. Gonda, „The c-Myb oncoprotein”, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, köt. 30, sz. 5, o. 547–551, máj. 1998.
[285] A. M. Cole, T. Ganz, A. M. Liese, M. D. Burdick, L. Liu, és R. M. Strieter, „Cutting edge: IFN-inducible ELR- CXC chemokines display defensin-like antimicrobial activity”, *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, köt. 167, sz. 2, o. 623–627, júl. 2001.
[286] A. Egesten *és mtsai.*, „The CXC chemokine MIG/CXCL9 is important in innate immunity against Streptococcus pyogenes”, *J. Infect. Dis.*, köt. 195, sz. 5, o. 684–693, márc. 2007, doi: 10.1086/510857.

[287] A. Sauty *és mtsai.*, „The T cell-specific CXC chemokines IP-10, Mig, and I-TAC are expressed by activated human bronchial epithelial cells”, *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, köt. 162, sz. 6, o. 3549–3558, márc. 1999.

[288] W. L. Beatty, T. A. Belanger, A. A. Desai, R. P. Morrison, és G. I. Byrne, „Role of tryptophan in gamma interferon-mediated chlamydial persistence”, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, köt. 730, o. 304–306, 0 1994.

[289] G. Tipples és G. McClarty, „The obligate intracellular bacterium Chlamydia trachomatis is auxotrophic for three of the four ribonucleoside triphosphates”, *Mol. Microbiol.*, köt. 8, sz. 6, o. 1105–1114, jún. 1993.

[290] C. C. Kuo és J. T. Grayston, „Amino acid requirements for growth of Chlamydia pneumoniae in cell cultures: growth enhancement by lysine or methionine depletion”, *J. Clin. Microbiol.*, köt. 28, sz. 6, o. 1098–1100, jún. 1990.

[291] D. Cao, J. J. Leffert, J. McCabe, B. Kim, és G. Pizzorno, „Abnormalities in uridine homeostatic regulation and pyrimidine nucleotide metabolism as a consequence of the deletion of the uridine phosphorylase gene”, *J. Biol. Chem.*, köt. 280, sz. 22, o. 21169–21175, jún. 2005, doi: 10.1074/jbc.M412343200.

[292] R. S. Stephens, K. Koshiyama, E. Lewis, és A. Kubo, „Heparin-binding outer membrane protein of chlamydiae”, *Mol. Microbiol.*, köt. 40, sz. 3, o. 691–699, máj. 2001.

[293] S. Nelson, C. M. Mason, J. Kolls, és W. R. Summer, „Pathophysiology of pneumonia”, *Clin. Chest Med.*, köt. 16, sz. 1, o. 1–12, márc. 1995.

[294] T. A. Moore, M. L. Perry, A. G. Getsoian, M. W. Newstead, és T. J. Standiford, „Divergent role of gamma interferon in a murine model of pulmonary versus systemic Klebsiella pneumoniae infection”, *Infect. Immun.*, köt. 70, sz. 11, o. 6310–6318, 0 2002.

[295] J. B. Rubins és C. Pomeroy, „Role of gamma interferon in the pathogenesis of bacteremic pneumococcal pneumonia”, *Infect. Immun.*, köt. 65, sz. 7, o. 2975–2977, júl. 1997.

[296] J. C. Deng, K. Tateda, X. Zeng, és T. J. Standiford, „Transient transgenic expression of gamma interferon promotes Legionella pneumophila clearance in immunocompetent hosts”, *Infect. Immun.*, köt. 69, sz. 10, o. 6382–6390, okt. 2001, doi: 10.1128/IAI.69.10.6382-6390.2001.

[297] M. E. Rottenberg, A. Gigliotti-Rothfuchs, és H. Wigzell, „The role of IFN-gamma in the outcome of chlamydial infection”, *Curr. Opin. Immunol.*, köt. 14, sz. 4, o. 444–451, 0 2002.

[298] S. Wang, Y. Fan, R. C. Brunham, és X. Yang, „IFN-gamma knockout mice show Th2-associated delayed-type hypersensitivity and the inflammatory cells fail to localize and control chlamydial infection”, *Eur. J. Immunol.*, köt. 29, sz. 11, o. 3782–3792, 0 1999.

[299] F. N. Lauw *és mtsai.*, „The CXC chemokines gamma interferon (IFN-gamma)-inducible protein 10 and monokine induced by IFN-gamma are released during severe melioidosis”, *Infect. Immun.*, köt. 68, sz. 7, o. 3888–3893, júl. 2000.

[300] A. Egesten *és mtsai.*, „SpeB of Streptococcus pyogenes differentially modulates antibacterial and receptor activating properties of human chemokines”, *PloS One*, köt. 4, sz. 3, o. e4769, 2009, doi: 10.1371/journal.pone.0004769.

[301] C. Karlsson *és mtsai.*, „SufA of the opportunistic pathogen finegoldia magna modulates actions of the antibacterial chemokine MIG/CXCL9, promoting bacterial survival during epithelial inflammation”, *J. Biol. Chem.*, köt. 284, sz. 43, o. 29499–29508, okt. 2009, doi: 10.1074/jbc.M109.025957.

[302] T. M. Handel, Z. Johnson, S. E. Crown, E. K. Lau, és A. E. Proudfoot, „Regulation of protein function by glycosaminoglycans--as exemplified by chemokines”, *Annu. Rev. Biochem.*, köt. 74, o. 385–410, 2005, doi: 10.1146/annurev.biochem.72.121801.161747.

[303] G. Wagels, S. Rasmussen, és P. Timms, „Comparison of Chlamydia pneumoniae isolates by western blot (immunoblot) analysis and DNA sequencing of the omp 2 gene”, *J. Clin. Microbiol.*, köt. 32, sz. 11, o. 2820–2823, 0 1994.

[304] K. D. Everett és T. P. Hatch, „Architecture of the cell envelope of Chlamydia psittaci 6BC”, *J. Bacteriol.*, köt. 177, sz. 4, o. 877–882, febr. 1995.
[305] K. Moelleken és J. H. Hegemann, „The Chlamydia outer membrane protein OmcB is required for adhesion and exhibits biovar-specific differences in glycosaminoglycan binding”, *Mol. Microbiol.*, köt. 67, sz. 2, o. 403–419, 0 2008, doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.06050.x.
[306] A. F. Cunningham és M. E. Ward, „Characterization of human humoral responses to the major outer membrane protein and OMP2 of Chlamydophila pneumoniae”, *FEMS Microbiol. Lett.*, köt. 227, sz. 1, o. 73–79, okt. 2003.
[307] I. Portig, J. C. Goodall, R. L. Bailey, és J. S. H. Gaston, „Characterization of the humoral immune response to Chlamydia outer membrane protein 2 in chlamydial infection”, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, köt. 10, sz. 1, o. 103–107, 0 2003.
[308] M. Eliasson, I.-M. Frick, M. Collin, O. E. Sørensen, L. Björck, és A. Egesten, „M1 protein of Streptococcus pyogenes increases production of the antibacterial CXC chemokine MIG/CXCL9 in pharyngeal epithelial cells”, *Microb. Pathog.*, köt. 43, sz. 5–6, o. 224–233, dec. 2007, doi: 10.1016/j.micpath.2007.06.007.
[309] F. N. Wuppermann, K. Mölleken, M. Julien, C. A. Jantos, és J. H. Hegemann, „Chlamydia pneumoniae GroEL1 protein is cell surface associated and required for infection of HEp-2 cells”, *J. Bacteriol.*, köt. 190, sz. 10, o. 3757–3767, máj. 2008, doi: 10.1128/JB.01638-07.
[310] M. V. Kuleshov *és mtsai.*, „Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update”, *Nucleic Acids Res.*, köt. 44, sz. W1, o. W90-97, 08 2016, doi: 10.1093/nar/gkw377.
[311] I. Bernstein-Hanley, Z. R. Balsara, W. Ulmer, J. Coers, M. N. Starnbach, és W. F. Dietrich, „Genetic analysis of susceptibility to Chlamydia trachomatis in mouse”, *Genes Immun.*, köt. 7, sz. 2, o. 122–129, márc. 2006, doi: 10.1038/sj.gene.6364285.
[312] I. Bernstein-Hanley, J. Coers, Z. R. Balsara, G. A. Taylor, M. N. Starnbach, és W. F. Dietrich, „The p47 GTPases Igtp and Irgb10 map to the Chlamydia trachomatis susceptibility locus Ctrq-3 and mediate cellular resistance in mice”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, köt. 103, sz. 38, o. 14092–14097, szept. 2006, doi: 10.1073/pnas.0603338103.
[313] C. Roshick, H. Wood, H. D. Caldwell, és G. McClarty, „Comparison of gamma interferon-mediated antichlamydial defense mechanisms in human and mouse cells”, *Infect. Immun.*, köt. 74, sz. 1, o. 225–238, 0 2006, doi: 10.1128/IAI.74.1.225-238.2006.
[314] H. Thorvaldsdóttir, J. T. Robinson, és J. P. Mesirov, „Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration”, *Brief. Bioinform.*, köt. 14, sz. 2, o. 178–192, márc. 2013, doi: 10.1093/bib/bbs017.
[315] G. Veres *és mtsai.*, „Central nervous system-specific alterations in the tryptophan metabolism in the 3-nitropropionic acid model of Huntington’s disease”, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, köt. 132, o. 115–124, 2015, doi: 10.1016/j.pbb.2015.03.002.
[316] K. Burian *és mtsai.*, „Transcriptome analysis indicates an enhanced activation of adaptive and innate immunity by chlamydia-infected murine epithelial cells treated with interferon γ”, *J. Infect. Dis.*, köt. 202, sz. 9, o. 1405–1414, 0 2010, doi: 10.1086/656526.
[317] R. M. Johnson, M. S. Kerr, és J. E. Slaven, „Plac8-dependent and inducible NO synthase-dependent mechanisms clear Chlamydia muridarum infections from the genital tract”, *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, köt. 188, sz. 4, o. 1896–1904, febr. 2012, doi: 10.4049/jimmunol.1102764.
[318] K. Rajaram és D. E. Nelson, „Chlamydia muridarum infection of macrophages elicits bactericidal nitric oxide production via reactive oxygen species and cathepsin B”, *Infect. Immun.*, köt. 83, sz. 8, o. 3164–3175, 0 2015, doi: 10.1128/IAI.00382-15.
[319] A. Tallam *és mtsai.*, „Gene Regulatory Network Inference of Immunoresponsive Gene 1 (IRG1) Identifies Interferon Regulatory Factor 1 (IRF1) as Its Transcriptional Regulator in Mammalian Macrophages”, *PloS One*, köt. 11, sz. 2, o. e0149050, 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0149050.

[320] J. Naujoks *és mtsai.*, „IFNs Modify the Proteome of Legionella-Containing Vacuoles and Restrict Infection Via IRG1-Derived Itaconic Acid”, *PLoS Pathog.*, köt. 12, sz. 2, o. e1005408, febr. 2016, doi: 10.1371/journal.ppat.1005408.

[321] C. J. Hall *és mtsai.*, „Immunoresponsive gene 1 augments bactericidal activity of macrophage-lineage cells by regulating β-oxidation-dependent mitochondrial ROS production”, *Cell Metab.*, köt. 18, sz. 2, o. 265–278, 0 2013, doi: 10.1016/j.cmet.2013.06.018.

[322] E. P. Balogh, I. Faludi, D. P. Virók, V. Endrész, és K. Burián, „Chlamydophila pneumoniae induces production of the defensin-like MIG/CXCL9, which has in vitro antichlamydial activity”, *Int. J. Med. Microbiol. IJMM*, köt. 301, sz. 3, o. 252–259, márc. 2011, doi: 10.1016/j.ijmm.2010.08.020.

[323] J. A. Loughman és D. A. Hunstad, „Induction of indoleamine 2,3-dioxygenase by uropathogenic bacteria attenuates innate responses to epithelial infection”, *J. Infect. Dis.*, köt. 205, sz. 12, o. 1830–1839, jún. 2012, doi: 10.1093/infdis/jis280.

[324] L. A. Sanni *és mtsai.*, „Dramatic changes in oxidative tryptophan metabolism along the kynurenine pathway in experimental cerebral and noncerebral malaria”, *Am. J. Pathol.*, köt. 152, sz. 2, o. 611–619, febr. 1998.

[325] S. Fujigaki *és mtsai.*, „L-tryptophan-L-kynurenine pathway metabolism accelerated by Toxoplasma gondii infection is abolished in gamma interferon-gene-deficient mice: cross-regulation between inducible nitric oxide synthase and indoleamine-2,3-dioxygenase”, *Infect. Immun.*, köt. 70, sz. 2, o. 779–786, febr. 2002, doi: 10.1128/iai.70.2.779-786.2002.

[326] M. E. Rottenberg *és mtsai.*, „Regulation and role of IFN-gamma in the innate resistance to infection with Chlamydia pneumoniae”, *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, köt. 164, sz. 9, o. 4812–4818, máj. 2000, doi: 10.4049/jimmunol.164.9.4812.

[327] M. Schmid, M. J. Lehmann, R. Lucius, és N. Gupta, „Apicomplexan parasite, Eimeria falciformis, co-opts host tryptophan catabolism for life cycle progression in mouse”, *J. Biol. Chem.*, köt. 287, sz. 24, o. 20197–20207, jún. 2012, doi: 10.1074/jbc.M112.351999.

[328] L. Huang, L. Li, K. D. Klonowski, S. M. Tompkins, R. A. Tripp, és A. L. Mellor, „Induction and role of indoleamine 2,3 dioxygenase in mouse models of influenza a virus infection”, *PloS One*, köt. 8, sz. 6, o. e66546, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0066546.

[329] L. Desvignes és J. D. Ernst, „Interferon-gamma-responsive nonhematopoietic cells regulate the immune response to Mycobacterium tuberculosis”, *Immunity*, köt. 31, sz. 6, o. 974–985, 0 2009, doi: 10.1016/j.immuni.2009.10.007.

[330] A. Blumenthal *és mtsai.*, „M. tuberculosis induces potent activation of IDO-1, but this is not essential for the immunological control of infection”, *PloS One*, köt. 7, sz. 5, o. e37314, 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0037314.

[331] S. G. Cady és M. Sono, „1-Methyl-DL-tryptophan, beta-(3-benzofuranyl)-DL-alanine (the oxygen analog of tryptophan), and beta-[3-benzo(b)thienyl]-DL-alanine (the sulfur analog of tryptophan) are competitive inhibitors for indoleamine 2,3-dioxygenase”, *Arch. Biochem. Biophys.*, köt. 291, sz. 2, o. 326–333, 0 1991, doi: 10.1016/0003-9861(91)90142-6.

[332] R. Metz, J. B. Duhadaway, U. Kamasani, L. Laury-Kleintop, A. J. Muller, és G. C. Prendergast, „Novel tryptophan catabolic enzyme IDO2 is the preferred biochemical target of the antitumor indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitory compound D-1-methyl-tryptophan”, *Cancer Res.*, köt. 67, sz. 15, o. 7082–7087, 0 2007, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-1872.

[333] K. W. Beagley, W. M. Huston, P. M. Hansbro, és P. Timms, „Chlamydial infection of immune cells: altered function and implications for disease”, *Crit. Rev. Immunol.*, köt. 29, sz. 4, o. 275–305, 2009, doi: 10.1615/critrevimmunol.v29.i4.10.

[334] J. M. Carlin és J. B. Weller, „Potentiation of interferon-mediated inhibition of Chlamydia infection by interleukin-1 in human macrophage cultures”, *Infect. Immun.*, köt. 63, sz. 5, o. 1870–1875, máj. 1995.

[335] A. Marangoni *és mtsai.*, „Infection of human monocytes by Chlamydia pneumoniae and Chlamydia trachomatis: an in vitro comparative study”, *BMC Res. Notes*, köt. 7, o. 230, ápr. 2014, doi: 10.1186/1756-0500-7-230.

[336] S. Airenne, H. M. Surcel, A. Bloigu, K. Laitinen, P. Saikku, és A. Laurila, „The resistance of human monocyte-derived macrophages to Chlamydia pneumoniae infection is enhanced by interferon-gamma”, *APMIS Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.*, köt. 108, sz. 2, o. 139–144, febr. 2000.

[337] Y. J. Liu, „Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity”, *Cell*, köt. 106, sz. 3, o. 259–262, 0 2001.

[338] C. Bogdan és U. Schleicher, „Production of interferon-gamma by myeloid cells--fact or fancy?”, *Trends Immunol.*, köt. 27, sz. 6, o. 282–290, jún. 2006, doi: 10.1016/j.it.2006.04.004.

[339] U. Wittkop *és mtsai.*, „Fate of Chlamydophila pneumoniae in human monocyte-derived dendritic cells: long lasting infection”, *Microb. Pathog.*, köt. 40, sz. 3, o. 101–109, márc. 2006, doi: 10.1016/j.micpath.2005.11.006.

[340] A. Polkinghorne, R. J. Hogan, L. Vaughan, J. T. Summersgill, és P. Timms, „Differential expression of chlamydial signal transduction genes in normal and interferon gamma-induced persistent Chlamydophila pneumoniae infections”, *Microbes Infect. Inst. Pasteur*, köt. 8, sz. 1, o. 61–72, 0 2006, doi: 10.1016/j.micinf.2005.05.018.

[341] J. T. Summersgill, N. N. Sahney, C. A. Gaydos, T. C. Quinn, és J. A. Ramirez, „Inhibition of Chlamydia pneumoniae growth in HEp-2 cells pretreated with gamma interferon and tumor necrosis factor alpha”, *Infect. Immun.*, köt. 63, sz. 7, o. 2801–2803, júl. 1995.

[342] L. G. Pantoja, R. D. Miller, J. A. Ramirez, R. E. Molestina, és J. T. Summersgill, „Characterization of Chlamydia pneumoniae persistence in HEp-2 cells treated with gamma interferon”, *Infect. Immun.*, köt. 69, sz. 12, o. 7927–7932, 0 2001, doi: 10.1128/IAI.69.12.7927-7932.2001.

[343] I. Fricke *és mtsai.*, „Mycobacteria induce IFN-gamma production in human dendritic cells via triggering of TLR2”, *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, köt. 176, sz. 9, o. 5173–5182, máj. 2006.

[344] L. A. Campbell és C. Kuo, „Chlamydia pneumoniae--an infectious risk factor for atherosclerosis?”, *Nat. Rev. Microbiol.*, köt. 2, sz. 1, o. 23–32, 0 2004, doi: 10.1038/nrmicro796.

[345] C. Yucesan és S. Sriram, „Chlamydia pneumoniae infection of the central nervous system”, *Curr. Opin. Neurol.*, köt. 14, sz. 3, o. 355–359, jún. 2001.

[346] C. W. Stratton és D. B. Wheldon, „Multiple sclerosis: an infectious syndrome involving Chlamydophila pneumoniae”, *Trends Microbiol.*, köt. 14, sz. 11, o. 474–479, 0 2006, doi: 10.1016/j.tim.2006.09.002.

[347] J. Peters, D. P. Wilson, G. Myers, P. Timms, és P. M. Bavoil, „Type III secretion à la Chlamydia”, *Trends Microbiol.*, köt. 15, sz. 6, o. 241–251, jún. 2007, doi: 10.1016/j.tim.2007.04.005.

[348] A. Tammiruusu, T. Penttilä, R. Lahesmaa, M. Sarvas, M. Puolakkainen, és J. M. Vuola, „Intranasal administration of chlamydial outer protein N (CopN) induces protection against pulmonary Chlamydia pneumoniae infection in a mouse model”, *Vaccine*, köt. 25, sz. 2, o. 283–290, 0 2007, doi: 10.1016/j.vaccine.2006.07.043.

[349] V. Sambri *és mtsai.*, „Experimental infection by Chlamydia pneumoniae in the hamster”, *Vaccine*, köt. 22, sz. 9–10, o. 1131–1137, márc. 2004, doi: 10.1016/j.vaccine.2003.09.035.

[350] H. F. Stills, „Adjuvants and antibody production: dispelling the myths associated with Freund’s complete and other adjuvants”, *ILAR J. Natl. Res. Counc. Inst. Lab. Anim. Resour.*, köt. 46, sz. 3, o. 280–293, 2005.

[351] H. C. Yip *és mtsai.*, „Adjuvant-guided type-1 and type-2 immunity: infectious/noninfectious dichotomy defines the class of response”, *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, köt. 162, sz. 7, o. 3942–3949, ápr. 1999.

[352] S. Halme, J. Latvala, R. Karttunen, I. Palatsi, P. Saikku, és H. M. Surcel, „Cell-mediated immune response during primary Chlamydia pneumoniae infection”, *Infect. Immun.*, köt. 68, sz. 12, o. 7156–7158, 0 2000.

[353] S. Bunk *és mtsai.*, „Immunoproteomic identification and serological responses to novel Chlamydia pneumoniae antigens that are associated with persistent C. pneumoniae infections”, *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, köt. 180, sz. 8, o. 5490–5498, ápr. 2008.

[354] H. McShane *és mtsai.*, „Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing antigen 85A boosts BCG-primed and naturally acquired antimycobacterial immunity in humans”, *Nat. Med.*, köt. 10, sz. 11, o. 1240–1244, 0 2004, doi: 10.1038/nm1128.

[355] C. Thorpe *és mtsai.*, „Discovery of a vaccine antigen that protects mice from Chlamydia pneumoniae infection”, *Vaccine*, köt. 25, sz. 12, o. 2252–2260, márc. 2007, doi: 10.1016/j.vaccine.2006.12.003.

[356] P. Pattnaik, A. R. Shakri, S. Singh, S. Goel, P. Mukherjee, és C. E. Chitnis, „Immunogenicity of a recombinant malaria vaccine based on receptor binding domain of Plasmodium falciparum EBA-175”, *Vaccine*, köt. 25, sz. 5, o. 806–813, 0 2007, doi: 10.1016/j.vaccine.2006.09.048.

[357] A. Wack *és mtsai.*, „Combination adjuvants for the induction of potent, long-lasting antibody and T-cell responses to influenza vaccine in mice”, *Vaccine*, köt. 26, sz. 4, o. 552–561, 0 2008, doi: 10.1016/j.vaccine.2007.11.054.

[358] S. Gong, Z. Yang, L. Lei, L. Shen, és G. Zhong, „Characterization of Chlamydia trachomatis plasmid-encoded open reading frames”, *J. Bacteriol.*, köt. 195, sz. 17, o. 3819–3826, szept. 2013, doi: 10.1128/JB.00511-13.

[359] D. Chen, L. Lei, C. Lu, A. Galaleldeen, P. J. Hart, és G. Zhong, „Characterization of Pgp3, a Chlamydia trachomatis plasmid-encoded immunodominant antigen”, *J. Bacteriol.*, köt. 192, sz. 22, o. 6017–6024, 0 2010, doi: 10.1128/JB.00847-10.

[360] M. Comanducci, S. Ricci, és G. Ratti, „The structure of a plasmid of Chlamydia trachomatis believed to be required for growth within mammalian cells”, *Mol. Microbiol.*, köt. 2, sz. 4, o. 531–538, júl. 1988.

[361] C. Hatt, M. E. Ward, és I. N. Clarke, „Analysis of the entire nucleotide sequence of the cryptic plasmid of Chlamydia trachomatis serovar L1. Evidence for involvement in DNA replication”, *Nucleic Acids Res.*, köt. 16, sz. 9, o. 4053–4067, máj. 1988.

[362] K. S. Sriprakash és E. S. Macavoy, „Characterization and sequence of a plasmid from the trachoma biovar of Chlamydia trachomatis”, *Plasmid*, köt. 18, sz. 3, o. 205–214, 0 1987.

[363] C. M. O’Connell, R. R. Ingalls, C. W. Andrews, A. M. Scurlock, és T. Darville, „Plasmid-deficient Chlamydia muridarum fail to induce immune pathology and protect against oviduct disease”, *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, köt. 179, sz. 6, o. 4027–4034, szept. 2007.

[364] X. Jiang, C. Shen, H. Yu, K. P. Karunakaran, és R. C. Brunham, „Differences in innate immune responses correlate with differences in murine susceptibility to Chlamydia muridarum pulmonary infection”, *Immunology*, köt. 129, sz. 4, o. 556–566, ápr. 2010, doi: 10.1111/j.1365-2567.2009.03157.x.

[365] X. Yang, K. T. HayGlass, és R. C. Brunham, „Genetically determined differences in IL-10 and IFN-gamma responses correlate with clearance of Chlamydia trachomatis mouse pneumonitis infection”, *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, köt. 156, sz. 11, o. 4338–4344, jún. 1996.

[366] H. Qiu *és mtsai.*, „Less inhibition of interferon-gamma to organism growth in host cells may contribute to the high susceptibility of C3H mice to Chlamydia trachomatis lung infection”, *Immunology*, köt. 111, sz. 4, o. 453–461, ápr. 2004, doi: 10.1111/j.0019-2805.2004.01835.x.

[367] H. Qiu *és mtsai.*, „Resistance to chlamydial lung infection is dependent on major histocompatibility complex as well as non-major histocompatibility complex determinants”, *Immunology*, köt. 116, sz. 4, o. 499–506, 0 2005, doi: 10.1111/j.1365-2567.2005.02249.x.

[368] M. L. Güler *és mtsai.*, „Genetic susceptibility to Leishmania: IL-12 responsiveness in TH1 cell development”, *Science*, köt. 271, sz. 5251, o. 984–987, febr. 1996.

[369] T. Nishimura *és mtsai.*, „Involvement of IL-4-producing Vbeta8.2+ CD4+ CD62L- CD45RB- T cells in non-MHC gene-controlled predisposition toward skewing into T helper type-2 immunity in BALB/c mice”, *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, köt. 158, sz. 12, o. 5698–5706, jún. 1997.

[370] M. Comanducci *és mtsai.*, „Expression of a plasmid gene of Chlamydia trachomatis encoding a novel 28 kDa antigen”, *J. Gen. Microbiol.*, köt. 139, sz. 5, o. 1083–1092, máj. 1993.

[371] Z. Li, S. Wang, Y. Wu, G. Zhong, és D. Chen, „Immunization with chlamydial plasmid protein pORF5 DNA vaccine induces protective immunity against genital chlamydial infection in mice”, *Sci. China Ser. C Life Sci. Chin. Acad. Sci.*, köt. 51, sz. 11, o. 973–980, 0 2008, doi: 10.1007/s11427-008-0130-9.

[372] Z. Gyulai *és mtsai.*, „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”, *J. Infect. Dis.*, köt. 181, sz. 5, o. 1537–1546, máj. 2000, doi: 10.1086/315445.

[373] T. Moore *és mtsai.*, „Fc receptor-mediated antibody regulation of T cell immunity against intracellular pathogens”, *J. Infect. Dis.*, köt. 188, sz. 4, o. 617–624, 0 2003, doi: 10.1086/377134.

[374] E. Marks, M. Verolin, A. Stensson, és N. Lycke, „Differential CD28 and inducible costimulatory molecule signaling requirements for protective CD4+ T-cell-mediated immunity against genital tract Chlamydia trachomatis infection”, *Infect. Immun.*, köt. 75, sz. 9, o. 4638–4647, szept. 2007, doi: 10.1128/IAI.00465-07.

[375] M. Johansson, K. Schön, M. Ward, és N. Lycke, „Studies in knockout mice reveal that anti-chlamydial protection requires TH1 cells producing IFN-gamma: is this true for humans?”, *Scand. J. Immunol.*, köt. 46, sz. 6, o. 546–552, 0 1997.

[376] A. J. Olive, D. C. Gondek, és M. N. Starnbach, „CXCR3 and CCR5 are both required for T cell-mediated protection against C. trachomatis infection in the murine genital mucosa”, *Mucosal Immunol.*, köt. 4, sz. 2, o. 208–216, márc. 2011, doi: 10.1038/mi.2010.58.

[377] N. R. Roan, T. M. Gierahn, D. E. Higgins, és M. N. Starnbach, „Monitoring the T cell response to genital tract infection”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, köt. 103, sz. 32, o. 12069–12074, 0 2006, doi: 10.1073/pnas.0603866103.

[378] M. Johansson, M. Ward, és N. Lycke, „B-cell-deficient mice develop complete immune protection against genital tract infection with Chlamydia trachomatis”, *Immunology*, köt. 92, sz. 4, o. 422–428, 0 1997.

[379] S. G. Morrison, C. M. Farris, G. L. Sturdevant, W. M. Whitmire, és R. P. Morrison, „Murine Chlamydia trachomatis genital infection is unaltered by depletion of CD4+ T cells and diminished adaptive immunity”, *J. Infect. Dis.*, köt. 203, sz. 8, o. 1120–1128, ápr. 2011, doi: 10.1093/infdis/jiq176.

[380] S. K. Kim *és mtsai.*, „Induction of HLA class I-restricted CD8+ CTLs specific for the major outer membrane protein of Chlamydia trachomatis in human genital tract infections”, *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, köt. 162, sz. 11, o. 6855–6866, jún. 1999.

[381] S. J. Rasmussen, P. Timms, P. R. Beatty, és R. S. Stephens, „Cytotoxic-T-lymphocyte-mediated cytolysis of L cells persistently infected with Chlamydia spp”, *Infect. Immun.*, köt. 64, sz. 6, o. 1944–1949, jún. 1996.

[382] M. N. Starnbach, M. J. Bevan, és M. F. Lampe, „Murine cytotoxic T lymphocytes induced following Chlamydia trachomatis intraperitoneal or genital tract infection respond to cells infected with multiple serovars”, *Infect. Immun.*, köt. 63, sz. 9, o. 3527–3530, szept. 1995.

[383] J. U. Igietseme, D. M. Magee, D. M. Williams, és R. G. Rank, „Role for CD8+ T cells in antichlamydial immunity defined by Chlamydia-specific T-lymphocyte clones”, *Infect. Immun.*, köt. 62, sz. 11, o. 5195–5197, 0 1994.

[384] M. N. Starnbach, M. J. Bevan, és M. F. Lampe, „Protective cytotoxic T lymphocytes are induced during murine infection with Chlamydia trachomatis”, *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, köt. 153, sz. 11, o. 5183–5189, 0 1994.

[385] E. P. Balogh *és mtsai.*, „Anti-chlamydial effect of plant peptides”, *Acta Microbiol. Immunol. Hung.*, köt. 61, sz. 2, o. 229–239, jún. 2014, doi: 10.1556/AMicr.61.2014.2.12.
[386] M. M. Rigano *és mtsai.*, „A novel synthetic peptide from a tomato defensin exhibits antibacterial activities against Helicobacter pylori”, *J. Pept. Sci. Off. Publ. Eur. Pept. Soc.*, köt. 18, sz. 12, o. 755–762, 0 2012, doi: 10.1002/psc.2462.
[387] H. Tiricz *és mtsai.*, „Antimicrobial nodule-specific cysteine-rich peptides induce membrane depolarization-associated changes in the transcriptome of Sinorhizobium meliloti”, *Appl. Environ. Microbiol.*, köt. 79, sz. 21, o. 6737–6746, 0 2013, doi: 10.1128/AEM.01791-13.
[388] R. Capparelli *és mtsai.*, „New perspectives for natural antimicrobial peptides: application as antinflammatory drugs in a murine model”, *BMC Immunol.*, köt. 13, o. 61, 2012, doi: 10.1186/1471-2172-13-61.
[389] U. Zügel és S. H. Kaufmann, „Role of heat shock proteins in protection from and pathogenesis of infectious diseases”, *Clin. Microbiol. Rev.*, köt. 12, sz. 1, o. 19–39, 0 1999.
[390] B. Henderson, E. Allan, és A. R. M. Coates, „Stress wars: the direct role of host and bacterial molecular chaperones in bacterial infection”, *Infect. Immun.*, köt. 74, sz. 7, o. 3693–3706, júl. 2006, doi: 10.1128/IAI.01882-05.
[391] P. J. Horner *és mtsai.*, „Association of antibodies to Chlamydia trachomatis heat-shock protein 60 kD with chronic nongonococcal urethritis”, *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.*, köt. 24, sz. 4, o. 653–660, ápr. 1997.
[392] P. Bavoil, R. S. Stephens, és S. Falkow, „A soluble 60 kiloDalton antigen of Chlamydia spp. is a homologue of Escherichia coli GroEL”, *Mol. Microbiol.*, köt. 4, sz. 3, o. 461–469, márc. 1990.
[393] S. M. Thomas *és mtsai.*, „IFN-gamma-mediated antimicrobial response. Indoleamine 2,3-dioxygenase-deficient mutant host cells no longer inhibit intracellular Chlamydia spp. or Toxoplasma growth”, *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, köt. 150, sz. 12, o. 5529–5534, jún. 1993.
[394] A. B. Tattersall, K. M. Bridgman, és A. Huitson, „Acetylcysteine (Fabrol) in chronic bronchitis--a study in general practice”, *J. Int. Med. Res.*, köt. 11, sz. 5, o. 279–284, 1983, doi: 10.1177/030006058301100505.
[395] S. De Flora, C. Grassi, és L. Carati, „Attenuation of influenza-like symptomatology and improvement of cell-mediated immunity with long-term N-acetylcysteine treatment”, *Eur. Respir. J.*, köt. 10, sz. 7, o. 1535–1541, júl. 1997, doi: 10.1183/09031936.97.10071535.
[396] S. Aslam, B. W. Trautner, V. Ramanathan, és R. O. Darouiche, „Combination of tigecycline and N-acetylcysteine reduces biofilm-embedded bacteria on vascular catheters”, *Antimicrob. Agents Chemother.*, köt. 51, sz. 4, o. 1556–1558, ápr. 2007, doi: 10.1128/AAC.00893-06.
[397] A.-C. Olofsson, M. Hermansson, és H. Elwing, „N-acetyl-L-cysteine affects growth, extracellular polysaccharide production, and bacterial biofilm formation on solid surfaces”, *Appl. Environ. Microbiol.*, köt. 69, sz. 8, o. 4814–4822, 0 2003, doi: 10.1128/aem.69.8.4814-4822.2003.
[398] M. Allen *és mtsai.*, „Mechanisms of Control of Mycobacterium tuberculosis by NK Cells: Role of Glutathione”, *Front. Immunol.*, köt. 6, o. 508, 2015, doi: 10.3389/fimmu.2015.00508.
[399] V. N. Lazarev *és mtsai.*, „The role of intracellular glutathione in the progression of Chlamydia trachomatis infection”, *Free Radic. Biol. Med.*, köt. 49, sz. 12, o. 1947–1955, 0 2010, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.024.
[400] S. Abromaitis és R. S. Stephens, „Attachment and entry of Chlamydia have distinct requirements for host protein disulfide isomerase”, *PLoS Pathog.*, köt. 5, sz. 4, o. e1000357, ápr. 2009, doi: 10.1371/journal.ppat.1000357.
[401] C. L. Haggerty, S. L. Gottlieb, B. D. Taylor, N. Low, F. Xu, és R. B. Ness, „Risk of sequelae after Chlamydia trachomatis genital infection in women”, *J. Infect. Dis.*, köt. 201 Suppl 2, o. S134-155, jún. 2010, doi: 10.1086/652395.
[402] A. Morice és P. Kardos, „Comprehensive evidence-based review on European antitussives”, *BMJ Open Respir. Res.*, köt. 3, sz. 1, o. e000137, 2016, doi: 10.1136/bmjresp-2016-000137.

[403] B. Yang *és mtsai.*, „Ambroxol suppresses influenza-virus proliferation in the mouse airway by increasing antiviral factor levels”, *Eur. Respir. J.*, köt. 19, sz. 5, o. 952–958, máj. 2002, doi: 10.1183/09031936.02.00253302.

[404] D. Kókai *és mtsai.*, „Ambroxol Treatment Suppresses the Proliferation of Chlamydia pneumoniae in Murine Lungs”, *Microorganisms*, köt. 9, sz. 4, o. 880, ápr. 2021, doi: 10.3390/microorganisms9040880.

[405] D. P. Virok *és mtsai.*, „Indoleamine 2,3-Dioxygenase Activity in Chlamydia muridarum and Chlamydia pneumoniae Infected Mouse Lung Tissues”, *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, köt. 9, o. 192, 2019, doi: 10.3389/fcimb.2019.00192.

[406] S. P. Umland *és mtsai.*, „The inhibitory effects of topically active glucocorticoids on IL-4, IL-5, and interferon-gamma production by cultured primary CD4+ T cells”, *J. Allergy Clin. Immunol.*, köt. 100, sz. 4, o. 511–519, okt. 1997, doi: 10.1016/s0091-6749(97)70144-1.

[407] J. M. Davies *és mtsai.*, „Budesonide and formoterol reduce early innate anti-viral immune responses in vitro”, *PloS One*, köt. 6, sz. 11, o. e27898, 2011, doi: 10.1371/journal.pone.0027898.

[408] D. Dora *és mtsai.*, „Neuroendocrine subtypes of small cell lung cancer differ in terms of immune microenvironment and checkpoint molecule distribution”, *Mol. Oncol.*, köt. 14, sz. 9, o. 1947–1965, szept. 2020, doi: 10.1002/1878-0261.12741.

[409] K. Maneechotesuwan, S. Supawita, K. Kasetsinsombat, A. Wongkajornsilp, és P. J. Barnes, „Sputum indoleamine-2, 3-dioxygenase activity is increased in asthmatic airways by using inhaled corticosteroids”, *J. Allergy Clin. Immunol.*, köt. 121, sz. 1, o. 43–50, jan. 2008, doi: 10.1016/j.jaci.2007.10.011.

[410] E. Feng *és mtsai.*, „Expression levels of induced sputum IL-8 and IL-10 and drug intervention effects in patients with acute exacerbated COPD complicated with chronic cor pulmonale at high altitude”, *Exp. Ther. Med.*, köt. 6, sz. 3, o. 747–752, szept. 2013, doi: 10.3892/etm.2013.1192.

[411] Y. Zhang *és mtsai.*, „IL-17A synergizes with IFN-γ to upregulate iNOS and NO production and inhibit chlamydial growth”, *PloS One*, köt. 7, sz. 6, o. e39214, 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0039214.

[412] Q. He *és mtsai.*, „Chlamydial infection in vitamin D receptor knockout mice is more intense and prolonged than in wild-type mice”, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, köt. 135, o. 7–14, máj. 2013, doi: 10.1016/j.jsbmb.2012.11.002.

[413] D. A. Youssef *és mtsai.*, „Antimicrobial implications of vitamin D”, *Dermatoendocrinol.*, köt. 3, sz. 4, o. 220–229, okt. 2011, doi: 10.4161/derm.3.4.15027.

[414] B. E. Lai, A. R. Geonnotti, M. G. Desoto, D. C. Montefiori, és D. F. Katz, „Semi-solid gels function as physical barriers to human immunodeficiency virus transport in vitro”, *Antiviral Res.*, köt. 88, sz. 2, o. 143–151, 0 2010, doi: 10.1016/j.antiviral.2010.08.006.

[415] A. A. A. Sater, D. M. Ojcius, és M. P. Meyer, „Susceptibility of Chlamydia trachomatis to the excipient hydroxyethyl cellulose: pH and concentration dependence of antimicrobial activity”, *Antimicrob. Agents Chemother.*, köt. 52, sz. 7, o. 2660–2662, júl. 2008, doi: 10.1128/AAC.00785-07.

[416] Y. Gao, A. Yuan, O. Chuchuen, A. Ham, K. H. Yang, és D. F. Katz, „Vaginal deployment and tenofovir delivery by microbicide gels”, *Drug Deliv. Transl. Res.*, köt. 5, sz. 3, o. 279–294, jún. 2015, doi: 10.1007/s13346-015-0227-1.

[417] N. R. Thomson *és mtsai.*, „Chlamydia trachomatis: genome sequence analysis of lymphogranuloma venereum isolates”, *Genome Res.*, köt. 18, sz. 1, o. 161–171, 0 2008, doi: 10.1101/gr.7020108.

[418] C. H. Davis és P. B. Wyrick, „Differences in the association of Chlamydia trachomatis serovar E and serovar L2 with epithelial cells in vitro may reflect biological differences in vivo”, *Infect. Immun.*, köt. 65, sz. 7, o. 2914–2924, júl. 1997.

[419] T. Fechtner, S. Stallmann, K. Moelleken, K. L. Meyer, és J. H. Hegemann, „Characterization of the interaction between the chlamydial adhesin OmcB and the human host cell”, *J. Bacteriol.*, köt. 195, sz. 23, o. 5323–5333, 0 2013, doi: 10.1128/JB.00780-13.

[420] M. R. Wills *és mtsai.*, „The human cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response to cytomegalovirus is dominated by structural protein pp65: frequency, specificity, and T-cell receptor usage of pp65-specific CTL”, *J. Virol.*, köt. 70, sz. 11, o. 7569–7579, nov. 1996, doi: 10.1128/JVI.70.11.7569-7579.1996.

[421] E. McLaughlin-Taylor *és mtsai.*, „Identification of the major late human cytomegalovirus matrix protein pp65 as a target antigen for CD8+ virus-specific cytotoxic T lymphocytes”, *J. Med. Virol.*, köt. 43, sz. 1, o. 103–110, máj. 1994, doi: 10.1002/jmv.1890430119.

[422] V. Endresz *és mtsai.*, „Induction of human cytomegalovirus (HCMV)-glycoprotein B (gB)-specific neutralizing antibody and phosphoprotein 65 (pp65)-specific cytotoxic T lymphocyte responses by naked DNA immunization”, *Vaccine*, köt. 17, sz. 1, o. 50–58, 0 1999, doi: 10.1016/S0264-410X(98)00145-5.

[423] R. Schirmbeck, W. Böhm, K. Ando, F. V. Chisari, és J. Reimann, „Nucleic acid vaccination primes hepatitis B virus surface antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in nonresponder mice”, *J. Virol.*, köt. 69, sz. 10, o. 5929–5934, okt. 1995.

[424] J. J. Kim *és mtsai.*, „Cytokine Molecular Adjuvants Modulate Immune Responses Induced by DNA Vaccine Constructs for HIV-1 and SIV”, *J. Interferon Cytokine Res.*, köt. 19, sz. 1, o. 77–84, 0 1999, doi: 10.1089/107999099314441.

[425] I. Danko, J. D. Fritz, S. Jiao, K. Hogan, J. S. Latendresse, és J. A. Wolff, „Pharmacological enhancement of in vivo foreign gene expression in muscle”, *Gene Ther.*, köt. 1, sz. 2, o. 114–121, 1994.

[426] T. E. Caver, T. D. Lockey, R. V. Srinivas, R. G. Webster, és J. L. Hurwitz, „A novel vaccine regimen utilizing DNA, vaccinia virus and protein immunizations for HIV-1 envelope presentation”, *Vaccine*, köt. 17, sz. 11, o. 1567–1572, márc. 1999, doi: 10.1016/S0264-410X(98)00355-7.

[427] D. Haddad *és mtsai.*, „Characterization of antibody responses to a Plasmodium falciparum blood-stage antigen induced by a DNA prime/protein boost immunization protocol”, *Scand. J. Immunol.*, köt. 49, sz. 5, o. 506–514, 1999, doi: 10.1046/j.1365-3083.1999.00543.x.

[428] J. F. L. Richmond *és mtsai.*, „Studies of the neutralizing activity and avidity of anti-human immunodeficiency virus type 1 Env antibody elicited by DNA priming and protein boosting”, *J. Virol.*, köt. 72, sz. 11, o. 9092–9100, 1998.

[429] E. Gönczöl *és mtsai.*, „Preclinical evaluation of an ALVAC (canarypox)--human cytomegalovirus glycoprotein B vaccine candidate”, *Vaccine*, köt. 13, sz. 12, o. 1080–1085, 0 1995, doi: 10.1016/0264-410x(95)00048-6.

[430] P. J. Lewis, S. van D. L. den Hurk, és L. A. Babiuk, „Altering the Cellular Location of an Antigen Expressed by a DNA-Based Vaccine Modulates the Immune Response”, *J. Virol.*, köt. 73, sz. 12, o. 10214–10223, dec. 1999, doi: 10.1128/JVI.73.12.10214-10223.1999.

[431] L. G. Radvanyi, A. Banerjee, M. Weir, és H. Messner, „Low levels of interferon-α induce CD86 (B7.2) expression and accelerates dendritic cell maturation from human peripheral blood mononuclear cells”, *Scand. J. Immunol.*, köt. 50, sz. 5, o. 499–509, 1999, doi: 10.1046/j.1365-3083.1999.00625.x.

[432] P. D. Ling, M. K. Warren, és S. N. Vogel, „Antagonistic effect on interferon-β on the interferon-γ-induced expression of Ia antigen in murine macrophages”, *J. Immunol.*, köt. 135, sz. 3, o. 1857–1863, 1985.

[433] B. L. McRae, R. T. Semnani, M. P. Hayes, és G. A. Van Seventer, „Type I IFNs inhibit human dendritic cell IL-12 production and Th1 cell development”, *J. Immunol.*, köt. 160, sz. 9, o. 4298–4304, 1998.

[434] M. E. Deming és K. E. Lyke, „A »mix and match« approach to SARS-CoV-2 vaccination”, *Nat. Med.*, júl. 2021, doi: 10.1038/s41591-021-01463-x.

8. 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.: Chlamydophila 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: Chlamydophila 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 γ
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 Chlamydophila pneumoniae
INTERNATIONAL JOURNAL OF MEDICAL MICROBIOLOGY (1438-4221 1618-0607): 299 7 pp 520-528 (2009)

15. Kis Z, Burian K, Treso 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 Chlamydophila pneumoniae.
Inflamm Res. 2008 Jun;57(6):287-95. doi: 10.1007/s00011-007-7124-0. PMID: 18516711

16. Kis Z, Treso 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 Chlamydophila pneumoniae FEMS IMMUNOLOGY AND MEDICAL MICROBIOLOGY (0928-8244 1574-695X): 52 3 pp 324-334 (2008)

17. Kis Z, Sas K, Gyulai Z, Treso 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)

8.1. Egyéb *in extenso* közlemények

1. Mário, 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; Zeghbib, 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. Mário, 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. Mário, 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
INFECTION AND DRUG RESISTANCE 13 pp. 4739-4749., 11 p. (2020)

12. Gajdács, Mário; 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, Mário; 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. Mário, 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, Mário; 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; Gácsi, 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. Mário, 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. Mário, 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. Mário, 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. Mário, 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, Mário; 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. Mário, 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, Timea; 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-α (TNF-α) Production and Tumor Necrosis Factor-Stimulated Gene-6 (TSG-6) Expression
FRONTIERS IN IMMUNOLOGY 10 Paper: 1406, 10 p. (2019)

33. Mário, Gajdács; Ilona, Dóczi; 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; Tiszlavicz, 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; Sátori, 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 chlamydophila pneumoniae
ACTA MICROBIOLOGICA ET IMMUNOLOGICA HUNGARICA 56: 4 pp. 389-397. , 9 p. (2009)

47. Petrovay, F; Heltai, K; Kis, Z; Treso, 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.
Chlamydophila 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; Endrész, 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: Chlamydophila (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; Endrész, 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; Endrész, V; Gönczöl, É
Cytomegalovírus fertőzések jelentősége Magyarországon
TRANSZFÚZIÓ 30: 4 pp. 159-165., 7 p. (1997)

9. Scientometriai adatok

Burián Katalin tudományos és oktatási közleményeinek összefoglalása MTA V. Orvostudományi Osztály (2021.10.05)

Tudományos és oktatási közlemények	Száma		Hivatkozások[1]	
	Összesen	Részletezve	Független	Összes
I. Folyóiratcikk[2]	83	---	---	---
szakcikk nemzetközi folyóiratban, idegen nyelvű	---	64	694	909
szakcikk, hazai idegen nyelvű	---	6	33	40
szakcikk, magyar nyelvű	---	7	13	19
szakcikk, sokszerzős, érdemi szerzőként[3]	---	1	17	21
összefoglaló közlemény	---	3	15	16
rövid közlemény	---	2	3	10
II. Könyv	0	---	---	---
a) Szakkönyv, kézikönyv, tankönyv szerzőként	0	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	0	0
magyar nyelvű	---	0	0	0
aa) Felsőoktatási tankönyv	---	0	0	0
b) Szakkönyv, kézikönyv, konferenciakötet, tankönyv szerkesztőként	0	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	---	---
magyar nyelvű	---	0	---	---
bb) Felsőoktatási tankönyv	---	0	---	---
III. Könyrészlet	12	---	---	---
idegen nyelvű	---	4	1	1
magyar nyelvű	---	0	0	0
cc) Felsőoktatási tankönyvfejezet	---	8	0	0
IV. Konferenciaközlemény[4]	0	---	0	0
Oktatási közlemények összesen (II.aa,bb-III.cc)	---	8	0	0
Tudományos közlemények összesen (I-IV.)	---	87	776	1016
Tudományos és oktatási közlemények összesen (I-IV.)	95	---	776	1016

V. További tudományos művek	30	---	---	---
További tudományos művek, ide értve a nem teljes folyóiratcikkeket és a nem ismert lektoráltságú folyóiratokban megjelent teljes folyóiratcikkeket is	---	30	0	0
Szerkesztőségi levelezés, hozzászólások, válaszok	---	0	0	0
Oltalmak, szabadalmak	---	0	0	0

VI. Hivatkozott absztraktok[5]	1	---	3	3
Összes hivatkozás[1]	---	---	779	1019
Hirsch index[6]	16	---	---	---
g index[6]	31	---	---	---

Speciális tudománymetriai adatok	Száma	Összes hivatkozás
Első szerzős teljes folyóiratcikkek száma[2]	5	178
Utolsó szerzős teljes folyóiratcikkek száma[2]	30	224
A tudományos fokozat (PhD) elnyerése utáni (2004) teljes tudományos folyóiratcikkek száma	70	516
Az utolsó 10 év (2011 - 2021) tudományos, teljes, lektorált tudományos folyóiratcikkeinek száma	59	392
A legmagasabb hivatkozottságú közlemény hivatkozásainak száma (az összes hivatkozás százalékában)	127	12 ,46%
Hivatkozások száma, amelyek nem szerepelnek a WoS/Scopus rendszerben	---	157
Jelentés, guideline	0	0
Csoportos (multicentrikus) közleményben kollaborációs közreműködő[7]	1	46

Megjegyzések:
1. a disszertáció és egyéb típusú hivatkozás nélküli, a WoS és/vagy Scopus rendszerben nyilvántartott adatok
2. lektorált, tudományos folyóiratban
3. a szerző írásban nyilatkozik, hogy érdemi szerzői hozzájárulásával készültek szerzőként jegyzett közleményei, és az érdemi hozzájárulást dokumentálni tudja
4. konferenciaközlemény folyóiratban, könyvben vagy egyéb konferenciakötetben
5. nem-hivatkozott absztrakt itt nem kerül az összesítésbe
6. a disszertáció és egyéb típusú hivatkozás nélküli összes hivakozással számolva. A Hirsch és a g indexdefiníciója
7. közreműködés esetén a csoportos szerzőségű közlemények hivatkozottsága külön értékelendő, és nemszámítható be az összesített hivatkozások közé
n.a. = nincs adat
Készült: 2021. október 5. 18:24