



OPPONENSI VÉLEMÉNY

Dr Burián Katalin

Chlamydia fajok és a cytomegalovírus okozta fertőzések jellemzői és megelőzésük lehetőségei

című MTA doktori disszertációjáról

A doktori értekezés témája:

Dr Burián Katalin „Chlamydia fajok és a cytomegalovírus okozta fertőzések jellemzői és megelőzésük lehetőségei” című doktori munkáját úgy molekuláris, mint klinikai szempontból igen jelentős kutatásnak tartom. A Chlamydia genus válogatott fajai által okozott fertőzések okozta betegségek, a fertőzések mechanizmusát, az aktivált immunfolyamatokat, visszafordíthatatlan károsodásokat, azok hátterét, gyógyszer rezisztenciáját vizsgálta. A téma rendkívül nagy jelentőségű a Chlamydia fertőzés okozta fertőzésekre adott immunválasz és a terápiára gyakorolt hatásának megértésében. A cytomegalovírus (CMV) egészséges immunrendszerű felnőtteknél általában tünetmentesen zajlik, esetenként influenzaszerű vagy a mononukleózis-szerű tünetek tapasztalhatók, de a mononukleózis kórokozójának (Epstein–Barr-vírus) kimutatható jelenléte nélkül. Elsősorban veleszületett, avagy újszülöttekben, illetve legyengült immunrendszerű egyéneknél alakul ki CMV fertőzés és a reaktiválódó CMV-fertőzés súlyos megbetegedést okozhat.

Összességében a rendkívül aprólékosan megtervezett és következetesen végrehajtott kutatások alapján született eredmények alapvető és a klinikai gyakorlatban is hasznosítható ismeretekkel szolgálnak.

Az értekezés részletes bírálata:

Formai és stiláris szempontok:

A doktori értekezés összesen 194 oldalból áll, amiből 4 oldal a tartalomjegyzék és a rövidítések listája. Ezt követi egy 20 oldalas bevezetés, mely részletes áttekintést ad a kutatás háttéréről, a Chlamydia fajok és a cytomegalovírus okozta fertőzések egészségre gyakorolt hatásáról. Kissé szokatlan módon, a célkitűzés helyett a bevezetést az anyagok és módszerek fejezet követi, mely 23 oldalon rendkívül alaposan mutatja be az alkalmazott technikákat. A szerző ezt követően 1 oldalon tömören és világosan ismerteti a munka célkitűzéseit. Az eredményeket és azok megbeszélését az 51.-től a 150. oldalig olvashatjuk, majd a szerző összegzi következtetéseit és új megállapításait. A dolgozat végén 434 hivatkozást tartalmazó irodalomjegyzék található. A dolgozat 69 ábrát és 2 táblázatot tartalmaz.

Az értekezés témájának és célkitűzéseinek értékelése:

A doktori értekezés témája a chlamydia fajok és a CMV fertőzéssel összefüggő immunológiai változások vizsgálata in vitro és in vivo körülmények között. Az in vitro kísérletekben egér és emberi immunsejtek is alkalmazásra kerültek, míg az in vivo vizsgálatok során egér törzsek alkalmazására került sor, melyeket klinikai beteg minták vizsgálata követett.

A jelölt a munkája során fókuszált a különböző Chlamydia fajok által okozott infekciók és reinfekciók eredményeként fellépő immunológiai változásokra a gazdaszervezetben. Illetve vizsgálni kívánta a chlamydia fertőzések szerepét krónikus betegségekben és ehhez kapcsolódóan az IFN- γ szerepét. Fontos szerep jutott a jelölt munkája során a chlamydiák okozta fertőzések megelőzési, és terápiás lehetőségeinek, illetve a chlamydiák szaporodását befolyásoló tényezőknek.

A CMV fertőzések kapcsán a fertőzést kísérő celluláris és humorális immunválasz vizsgálatára koncentrált a jelölt.

Az értekezéshez vezető tudományos közleményekben alkalmazott módszerek értékelése

A jelölt az immunbiológia csaknem teljes eszköztárát felvonultatja a vizsgálatok során. Láthatóan rendkívüli tudással és hozzáértéssel választotta ki és alkalmazta a kísérletek értékeléséhez szükséges módszereket.

A chlamydia szaporítás során a chlamydia mennyiségének meghatározását indirekt immunfluoreszcens módszerrel végezték. A CMV fehérjéket kifejező, rekombináns canarypox vírusokat primer csirke fibroblaszton, míg a vaccinia vírust pedig Vero sejt kultúrán szaporították és mennyiségüket plakk formálódás útján, míg a kísérletekben használt rekombináns antigén fehérjéket spektrofotometriás

módszerrel határozták meg. A kísérleti eszköztárban az általános sejt-alapú módszerek (a célok megvalósításához legideálisabb sejtvonalak tenyésztése, primer egér szövetek és emberi sejtek, sejtpusztulás tesztelése) mellett, az antibakteriális vagy antivirális hatóanyagok szelektálása történt és kórokozók sejthez történő kötődését vizsgálták különféle kombinált kultúrák megvalósításával. A sejt felülúszókból a centrifugálást citokin és chemokin meghatározást végeztek. A fertőzés és kezelések hatására módosuló sejtes és in vivo válaszreakciók mérésére citokin és chemokin termelés meghatározásához immun- és transmissziós elektronmikroszkópos módszereket, sejt szelekciós technikákat, molekuláris biológiai módszereket (pl. valós idejű RT-PCR, plazmid preparátumok,), fehérje kimutatási módszereket (Western-blot, ELISPOT, hisztológia, áramlási citometria) is alkalmaztak. Az immunizálás hatását a megfelelő tesztrendszerekben kiegészítették tömegspektrometriás (liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)) és ELISA vizsgálattal is. Az in vitro, in vivo állatkísérletek és humán betegek adatainak feldolgozásával igazolja a felállított hipotéziseinek helyességét és az eredményeinek klinikai felhasználhatóságát. A vizsgálati minták száma, jellege és minősége megfelelő a célkitűzésben megfogalmazottak elvégzéséhez. Összegezve, a doktori értekezés vizsgálataiban alkalmazott módszerek minden tekintetben alkalmasak a kitűzött célok vizsgálatára, korszerűek és adekvát módon kerültek alkalmazásra.

Scientometriai szempontok

Az MTA doktori mű alapjául 20 in extenso közlemény szolgált. Ezek közül 12 esetben állapítható meg a szerző vezető szerepe (első vagy utolsó szerző). A szerző összesen 90 angol nyelvű szakcikk szerzője/társ szerzője, melyekre a bíráló elkészítésének időpontjában összesen 1553 hivatkozást kapott. H-indexe: 20, míg g-indexe: 36. Az elmúlt tíz évben (2013-2023 között) a szerző 3 „high impact” publikáció szerzője és D1-es besorolású kutató. Mindezen mutatók alapján megállapítható, hogy a jelölt tudományos aktivitása meghaladja az MTA doktori eljárásban a szakterületén elvárt küszöbértéket.

A dolgozatot érintő megjegyzéseim és kérdéseim

Megjegyzések

1. A dolgozat magyar nyelven íródott, a témát kiválóan leíró és érthető stílusban. Egyetlen megjegyzésem, hogy a módszertant a célkitűzések után tenném, mivel általában a vizsgálatok elvégzéséhez alakítja a kutató a módszertant. Ám ez semmit sem von le a munka értékéből.

2. A dolgozat csak néhány táblázatot tartalmaz, noha számos esetben még az összegzett forma is táblázat beiktatását igényelné, illetve megkönnyítené a különféle szekvenciák beazonosítását pl a primer szekvenciák felsorolásánál, stb, mely áttekinthetőbbé tenné a dolgozatot.
3. Noha a dolgozat ábráit magyarra fordította a szerző, a grafikonok színeinek egységesítése is szerencsés lett volna a fekete-fehér, a szürke összes árnyalata, kék, piros és egyéb színek felhasználása helyett.
4. A módszertan felsorolásakor a 2.36 pontban a „Humán kísérletek” címszó helyett szerencsésebb megfogalmazás lett volna pl Humán minták feldolgozása vagy valami hasonló beillesztése.
5. Kifejezetten előnyösnek találtam azt a megoldást, hogy a munka alegységei előtt a feltett tudományos kérdéseket, majd a fejezet végén az eredmények értelmezését és annak összegzését is olvashatjuk. Igen áttekinthetővé vált az értekezés.

Kérdések

1. Igazolták, hogy az IgM ellenanyag a reinfekciók során is újra megjelenik az egerek keringésében. Alacsony IgG2a/IgG1 arányt mértek a primer fertőzést követően, ezzel szemben magasabb IgG2a/IgG1 arányt a reinfekciók után, és megállapították, hogy ez a primer fertőzés és a reinfekció elkülönítéséhez hasznos markerként szolgálhat. **Hogyan állapítható meg az, hogy mit tekinthetünk alacsony vagy magas IgG2a/IgG1 arálynak emberben, amely klinikai szempontból is hasznosítható információval szolgálhat?**
2. Génexpressziós, hisztopatológiai, funkcionális, valamint in vivo neutralizációs vizsgálattal is bizonyította, hogy azIDO kifejeződik és anti-mikrobiális hatással rendelkezik chlamydia fertőzött egerekben. **Hogyan magyarázható, hogy azIDO anti-mikrobiális hatással rendelkezik, ha a triptofán metabolizmusIDO aktivitás fokozódása következtében tolerogén immunválasz kialakulásához vezethet?**
3. **Az egérben végzett in vivo immunológiai vizsgálatok eredményei mennyire korrelálthatók a humán immunválaszokkal chlamydia fertőzések esetén?**
4. Kísérleteivel igazolta, hogy a mukolitikumként gyakran használt N-acetyl-cystein (NAC) in vitro és in vivo egerekben is fokozza a C. pneumoniae szaporodását. Bizonyította, 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. **Milyen módszerekkel bizonyítaná az**

egérben tapasztalt kezelések eredményének hasonlóságát vagy eltérő eredményeit in vitro módszerekkel emberben?

5. Hogyan magyarázná a CMV aktiválta CD8 T sejtek memória típusú markerek expresszióját a fertőzést követően? Hogyan hatnak ezek későbbi, avagy a CMV-től eltérő vírusok által kiváltott fertőzésre?

Új megállapítások

A fenti kérdésekre és észrevételekre adott válaszoktól függetlenül a jelölt új tudományos eredményeinek fogadom el a következőket:

1. Kimutatta, hogy a *C. pneumoniae* fertőzés hatására elsősorban CD4+ T sejtek IL-17A-t termelnek fertőzött egerek tüdejében. Az IL-17A in vivo neutralizálása csökkent chemokin termelődéshez és neutrophil granulocytá beáramláshoz, és visszatenyészthető chlamydia hozamhoz vezet. Ismételt Chlamydia fertőzések kései szakaszában fokozott IL-17E kifejeződését mérte, és megállapította, hogy élő chlamydia jelenléte szükséges.
2. A *C. pneumoniae* fertőzéses modelljében leírta a bakteriális DNS megjelenésének kinetikáját úgy a tüdőben, mint a vérben. Igazolta, hogy az IgM ellenanyag a reinfekciók során is újra megjelenik az egerek keringésében. Alacsony IgG2a/IgG1 arányt mérhető a primer fertőzést követően, ezzel szemben magasabb IgG2a/IgG1 az arány a reinfekciók után.
3. Bizonyította, hogy a *C. trachomatis* szaporodik a bél eredetű Caco-2 sejtekben, és a fertőzés alacsony szintű hBD-2 termelést eredményez, ami hozzájárulhat a patogén gastrointestinális túléléséhez, valamint az onnan történő rekurrens genitális fertőzésekhez.
4. Bizonyította, hogy az ApoB100only/LDLR^{-/-} egerek megfertőzhetők *C.pneumoniae*val, és a baktérium RNS-ének kimutatásával az aktívan metabolizáló kórokozó jelenléte az aortában, valamint kimutatta, hogy a fertőzés fokozta az atherosclerosis progresszióját normál diéta mellett.
5. Bizonyította, 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, és hogy a MIG/CXCL9 anti-chlamydiás hatása függ a koncentrációtól, az időtől és a vizsgált chlamydia törzstől.

6. Kimutatta, hogy a *C. pneumoniae* fertőzés indukálja az egerek tüdejében a CXC chemokinek expresszióját, és igazolta, hogy a MIG/CXCL9 kötődésért *C. pneumoniae* 60 kDa molekulású proteinje felelős.
7. Génexpressziós, hisztopatológiai, funkcionális, valamint in vivo neutralizációs vizsgálattal is bizonyította, hogy az IDO kifejeződik és anti-mikrobiális hatással rendelkezik chlamydia fertőzött egerekben.
8. Kimutatta, hogy a *C. pneumoniae* fertőzött DC szubpopuláció IFN-g termelésre képes, viszont az nem befolyásolja a kórokozó szaporodását a DC-kben.
9. Bizonyította, hogy a chlamydia LcrE proteinnel történt immunizálásra az egerek humorális és T-sejtes immunválasszal reagálnak és az LcrE vakcina protektív hatással rendelkezik chlamydia fertőzéssel szemben az immunizált egerekben.
10. Igazolta, hogy *C. muridarum* fertőzés során pGP3 és pGP4 specifikus ellenanyagok és T-sejtek képződnek egerekben, de az egerek genetikai háttere meghatározó a *C. muridarum* fertőzés a pGP3 chlamydia plazmid protein felismerésének módjára.
11. Bizonyította, 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. Kimutatta, hogy a vizsgált 11 NCR peptid közül 7 anti-chlamydiás hatással rendelkezik, és azonosította a GroEL fehérjét, mint az anti-chlamydiás hatással bíró NCR247 peptid kötéséért felelős ligandot.
13. Kísérleteivel igazolta, hogy a mukolitikumként gyakran használt N-acetyl-cystein (NAC) in vitro és in vivo egerekben is fokozza a *C. pneumoniae* szaporodását. Bizonyította, hogy az Ax in vitro csökkenti a *C. pneumoniae* szaporodását, viszont a humán dózisonak megfelelő koncentrációban alkalmazva nem befolyásolja a *C. pneumoniae* szaporodását az egerek tüdejében.
14. Megállapította, 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. Igazolta, 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. 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. Kísérletei 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 oltott, továbbá a pVR-gB Δ tm DNS vakcinával alapimmunizált egerekben, a gB alegység booster oltás szignifikánsan növelte a gB specifikus ellenanyagszintet.

Összefoglalás, javaslat

Burián Katalin MTA doktorjelölt értekezése rendkívül magas színvonalú tudományos kutatómunka eredményeinek összefoglalása. A doktori értekezésből egyértelműen a Chlamydia fajok és a cytomegalovírus okozta fertőzések, a fertőzések jellemzőinek és megelőzésük lehetőségeinek, immunológiai hátterének alapos ismerője rajzolódik ki, aki szerteágazó metodikai jártassággal és kreatív gondolkodással rendelkezik. Mivel a jelölt a PhD fokozata óta végzett önálló kutatói munkája kiválóan dokumentált a doktori műben, az értekezés nyilvános vitára tűzését és sikeres védelem esetén a jelölt részére az „MTA Doktora” cím odaítélését javaslom.

Pécs, 2023. november 05.



Dr Pongrácz Judit
egyetemi tanár, az MTA doktora