

A kardiovaszkuláris rendszer és a gasztrointesztinális traktus *Chlamydia* fertőzésének modellezése

Ph.D. Tézis

Lantos Ildikó Ilona



Témavezető: Endrész Valéria Ph.D.

Orvosi Mikrobiológiai és Immunbiológiai Intézet

Általános Orvostudományi Kar

Szegedi Tudományegyetem

Szeged

2018

1. Bevezetés

1.1. *Chlamydiaceae*

Chlamydiaceae baktériumcsalád *Chlamydia* nemzetsége tizenegy fajból áll, ezek közül kettő fontos humánpatogén: a *C. trachomatis* és a *C. pneumoniae*. A többi faj elsősorban állatok kórokozója. A *Chlamydiák* Gram-negatív obligát intracelluláris baktériumok egyedi fejlődési ciklussal rendelkeznek, melyben két fő fejlődési formában léteznek: az elementáris test (EB) és a retikuláris testtel (RB). Kialakulhat egy harmadik forma, melyet atipikus, aberráns vagy perzisztens formának is neveznek. A chlamydiák fejlődési ciklusa transzkripciós szinten szabályozott. *Chlamydia* gének expressziójának három fő fázisa van: a korai, középső és a késői gének kifejeződése. A perzisztens fázisban lévő *Chlamydiák* fejlődési ciklusa megváltozott, gén expressziós mintázatot mutat.

1.1.1. *Chlamydia pneumoniae*

Chlamydia pneumoniae (*Cpn*) egy gyakori humán légúti patogén, okoz, faringitist, szinuszitist, akut és krónikus bronhitiszt, valamint a krónikus bronhitisz súlyosbodását okozhatja, és jelentős kórokozója a közösségben szerzett tüdőgyulladásnak. Gyakori krónikus/perzisztens fertőzés és az újrafertőződés. Az extrapulmonáris megbetegedések széles spektrumát hozták összefüggésbe a *Cpn*-val. Számos tanulmány vizsgálja a *Cpn* fertőzés és atheroszklerózis kapcsolatát.

1.2. Az atheroszklerózis

Az atheroszklerózis (vagy érlemezés) a vezető halálokok között szerepel világszerte. Krónikus betegség, mely krónikus gyulladással, endotél diszfunkciójával és az érfalban lipid felhalmozódással jár. Az atheroszklerózisnak számos jól ismert kockázati tényezője van. Az atheroszklerotikus plakkok kialakulását elősegítő legfontosabb kóros folyamat az alacsony sűrűségű lipoprotein (LDL) részecskék szubendoteliális lerakódása és módosítása, majd az LDL eredetű lipidek felhalmozódása az intimában. A magas plazma LDL-koleszterin, különösen a magas oxidált LDL szint, hozzájárul az atheroszklerotikus elváltozás kialakulásához. Az endotél sérülése trombocita aggregációhoz és vérlemezke faktorok felszabadulásához vezet, amelyek a simaizomsejtek proliferációját indukálják az artéria intimában.

Az atheroszklerózissal összefüggő megbetegedések 90%-áért a klasszikus rizikó faktorok a felelősek. Egyéb kockázati tényezők, mint például a fertőzések hozzájárulhatnak a betegség kifejlődéséhez. Számos fertőző ágens: vírusokat, baktériumokat és parazitákat hoztak kapcsolatba az atheroszklerózis fokozott kockázatával.

Bizonyítékot a *Cpn* fertőzés atheroszklerózis patogenezisében betöltött szerepére szeroepidemiológiai tanulmányok, a baktérium komponenseinek direkt detektálása az atheroszklerotikus léziókban hisztológiával, elektron mikroszkópiával, PCR módszerrel, életképes baktérium atheroszklerotikus plakkból történt kimutatása, *in vitro* és *in vivo* állat kísérletek állnak szolgálatnak.

In vitro kísérletek során az atheroszklerotikus plakkokat alkotó sejteket sikeresen fertőzték *Cpn*-val, pl. *Cpn*-val fertőztek simaizom sejteket és endotél sejteket, és a fertőzés gyulladáshoz citokinek, leukocita adhéziós molekulák termelésére készítette ezeket a sejteket.

In vivo tanulmányokban *Cpn* fertőzés hatására súlyosbodtak az atheroszklerotikus léziók az atheroszklerózis modelljéül szolgáló hiperlipidémiás állatokban.

1.3. Atheroszklerózis egér modellek

Számos állat modell áll rendelkezésre az atheroszklerózis kórfolyamatának vizsgálatára. Az állat modellek fontos szerepet játszanak olyan kísérletekben, ahol a cél az atheroszklerózis

kialakulásában szerepet játszó mechanizmusának kiderítése és lipid csökkentő gyógyszereken túlmutató új terápiás szerek kutatása. Normál egerekben nem fejlődik atheroszklerózis, és hosszú távú zsíros diéta szükséges az atherogenezis előidőzéséhez. Vannak azonban stabil genetikailag módosított beltenyésztett egér törzsek, melyek lehetővé teszik az atheroszklerózis fejlődésének vizsgálatát egér modellben. A leggyakrabban használt egér törzsek az ApoE-deficiens (ApoE^{-/-}), az LDL receptor-deficiens (LDLR^{-/-}), a humán apoB100 transzgenikus és az LDLR^{-/-}/ApoE^{-/-} kettős géniütött vagy az ApoE-Leiden transzgenikus egerek. ApoE^{-/-} egerekben spontán is fejlődik atheroszklerózis. Azonban ezekben az egerekben a lipid profil/mintázat eltérő a legtöbb atheroszklerózisban szenvedő emberben megfigyelttől, pl. magas az apolipoprotein (apo) B48-t tartalmazó LDL plazma szintje a magas apoB100-t tartalmazó LDL szint helyett, ez utóbbi figyelhető meg a hiperkoleszterinémias embereknél. Az ApoB100only/LDLR^{-/-} egerek egy olyan *apoB* gént hordoznak, amelynek a mutációja megakadályozza a rövidebb apoB forma, az apoB48 expresszióját, hasonlóan az emberekhez, akikben nem történik meg az apoB rövid formájának kialakulása a májban. LDLR hiánya megakadályozza az apoB100 felvételét a szövetekbe, mely magas apoB100 tartalmú, koleszterinben gazdag LDL plazma szintet eredményez. Az egér törzset létrehozó szerzők úgy írták le ezeket az egereket, mint a humán familiáris hiperkoleszterinémia hű modelljei.

1.4. *Cpn* fertőzés hatása az atheroszklerózis állatmodelljeiben

Az első állatkísérletekben a *Cpn* fertőzés fokozta az atheroszklerotikus léziók fejlődését normál diétán tartott nyulakban. Ma leggyakrabban a lipid anyagcserében elváltozást szenvedő genetikailag módosított egereket használnak a *Cpn* fertőzés és az atheroszklerózis kapcsolatának vizsgálatára.

Egerekben az intranazális *Cpn* fertőzés alsó légúti megbetegedést hasonlóan a humán *Cpn* fertőzéshez. A fertőzést követően a baktérium szétterjed a szervezetben, a *Chlamydia* DNS kimutatható az egerek keringésében. Leggyakrabban az emberi krónikus *Cpn* fertőzést utánozó, többszöri *Cpn* fertőzés után vizsgálják az atheroszklerózis fokozódását a diéta indukálta hiperlipidémias C57BL/6J, vagy LDLR^{-/-}, ApoE^{-/-}, LDLR^{-/-}/ApoE^{-/-} vagy ApoE-Leiden transzgenikus egerekben, és legtöbbször az atheroszklerotikus léziók súlyosbodását észlelik.

A *Cpn* fertőzés immun mechanizmusokra gyakorolt hatását az atheroszklerózisban különböző géniütött egértörzsekben vizsgálják: TNF- α p55 receptor, IL-17A, TLR2, TLR4, MyD88 és indukálható nitrogén oxid szintáz (iNOS) knockout egereket használnak.

1.5. *Chlamydia trachomatis*

Chlamydia trachomatis (*C. trachomatis*) a leggyakoribb szexuális úton terjedő bakteriális patogén és a vakságot okozó trachoma kórokozója. Két biovariánssal rendelkezik: az okulogenitális (A-K szerovariánsok) és a lymphogranuloma venereum (L szerovariánsok) biovariánsok.

A szexuális úton terjedő szerovariánsok esetében az elsődleges fertőzés a méhnyakban vagy a húgycsőben fordul elő. Férfiakban a nem-gonorrhéas húgycsőgyulladás 50%-ában a *C. trachomatis*-t azonosítják kórokozóként. Nőkben a fertőzés a méhnyak gyulladását okozza, onnan gyakran felszálló fertőzésként a méhbe és a petefészekbe terjed. A *C. trachomatis* genitális fertőzések nagyon gyakran tünetmentesek férfiakban is és nőkben is. A tünetmentes fertőzések nagyszámú fel nem ismert fertőzött egyént eredményez, akik képesek megfertőzni a szexuális partnerüket. Az akut fertőzés, a tünetmentes fertőzés és a fel nem ismert és kezeletlen fertőzés krónikus fertőzéshez vezet, mely súlyos következményekkel járhat. Férfiakban a mellékhere és a prosztata gyulladása lehetnek a szövődmények, amelyek negatív hatással lehetnek nemzőképességre, és a reaktív ízületi gyulladást és a Reiter-szindrómát is okozhatnak. Nőkben súlyos szövődmény a kismencedei gyulladás (PID), mely a méh, a petefészek és a

petevezeték gyulladásával jár. A petevezeték elzáródása okozta meddőség, a méhen kívül terhesség és a krónikus kismencedencei fájdalom a PID súlyos következményei lehetnek.

1.6. Chlamydiák a gasztrointesztinális traktusban

Állati patogén *Chlamydia* fajokat számos állatfajból izoláltak, így pl. kérődzőkből, sertésekből és madár fajokból; különböző szervekben és a székletben is kimutatták azokat. A legtöbb állatban *Chlamydia* a gasztrointesztinális (GI) traktusban perzisztál, és feko-orális úton terjed. Egerekben a *C. muridarum*-mal szájon át történő fertőzés hosszan tartó perzisztens fertőzést eredményez a GI traktusban. A GI traktus ideális helynek tűnik a *Chlamydia* hosszas fennmaradásához a csökkent immunválasz készség miatt.

Emberben a női genitális traktus tartós vagy visszatérő *C. trachomatis* fertőzésének természete még nem ismert. Feltételezik, hogy a genitális traktus fertőzése a GI traktus fertőzésével társul, ami orális fertőzés, a genitális váladékokkal való autoinokuláció, vagy szexuális tevékenység révén valósulhat meg. Számos tanulmány vizsgálja a genitális traktus chlamydiával való újrafertőződésének lehetőségét a perzisztensen fertőzött GI traktusból emberben.

1.7. *C. trachomatis* szaporodása különböző sejtvonalakban

Korábban a *Chlamydia* fertőzések diagnosztizálására és *in vitro* kísérletekben a *Chlamydia* replikáció jellemzése céljából főleg epitél sejteket használtak, mivel ezek a chlamydiák elsődleges célsejtjei. A *C. trachomatis* D-L szerovariánsok tenyésztésére elsősorban nem-polarizált, cervix eredetű HeLa sejteket használnak. A genitális traktuson kívüli *Chlamydia* fertőzések patomechanizmusának vizsgálatára hagyományos epitél sejtektől eltérő sejteket is használnak.

Korábbi tanulmányokban az állati *Chlamydia* fajok növekedését különféle eredetű sejtvonalakban vizsgálták. A bélnyálkahártya eredetű Caco-2 sejtekben a zárványok a sertésekből származó *C. pecorum* és *C. suis* növekedését mutatták, így a Caco-2 sejtek alkalmas gazdasejtnek mutatkoztak az állati *Chlamydiák* számára. Ha a *C. trachomatis* fenn tud maradni a humán GI traktusban, akkor érdemes a *C. trachomatis* növekedési tulajdonságait vizsgálni a Caco-2 sejtekben. A Caco-2 sejtvonal megfelelő modell lehet a humán GI traktusbeli *Chlamydia* fertőzés vizsgálatára.

1.8. Defenzinek

A defenzinek a baktériumok, gombák és burkos vírusok elleni antimikrobiális peptidok egy fontos családja. A humán béta-defenzin (hBD)-2 jelen van a bőrben, a légutakban és a GI traktusban. Főleg epitél sejtek termelik gyulladás és fertőzés hatására, de monociták, makrofágok és dendritikus sejtek is képesek termelni. A vastagbél nyálkahártyájában a defenzinek, és köztük a hBD-2, a gazdaszervezet veleszületett védekező rendszerének fontos effektorát képviselik nem csak mikroba ellenes hatásuk révén, hanem mert kapcsolatot teremtenek az adaptív immunrendszerrel, az éretlen dendritikus sejtek és a memória T sejtek vonzásával. A bélnyálkahártya epitél sejtjeinek fontos szerepe, hogy fizikai akadályt képeznek kórokozókval szemben és a veleszületett immunrendszer részeként működnek. *In vitro* kísérletekben a *C. trachomatis* fertőzés aktiválja a hBD-2 termelését, és ki mutatták RT-PCR-rel a chlamydiával fertőzött nők cervico-vaginalis folyadékából. A Caco-2 sejtek hBD-2 termelése *Chlamydia* fertőzés hatására a veleszületett immunválasz stimulálását jelezné a GI traktusban.

2. Célkitűzések

A jelen tanulmány célkitűzései a következők voltak:

Célkitűzés 1: többszöri *Cpn* fertőzés potenciális aterogén hatásának vizsgálata ApoB100only/LDLR^{-/-} egerekben.

Célkitűzés 2: a *C. trachomatis* növekedési sajátosságainak vizsgálata bélhámsejtekben, melyek a human fertőzések során lehetséges célsejtek, és a fertőzés indukálta defenzin termelődés vizsgálata ezekben a sejtekben.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Sejtvonalak

Caco-2, HeLa 229, HEp-2 és McCoy sejteket Earle-féle sókat tartalmazó „minimal essential” tápfolyadékban (MEM) szaporítottuk, mely a következő adalékokat tartalmazta: 10% FBS, 2 mmol/L L-glutamin, 1x MEM vitaminkeverék, 1x nem esszenciális aminosav keverék, 25 µg/mL gentamicin, és 0.5 µg/mL fungizon. A sejtvonalakat az ATCC-től vásároltuk.

3.2. Baktérium törzsek

A *Chlamydia pneumoniae* (*Cpn*) CWL029 törzset és a *Chlamydia trachomatis* D serovariáns UW-3/CX törzset használtuk, melyek az ATCC-től származtak. *Cpn*-t HEp-2 sejteken, míg a *C. trachomatis*-t McCoy sejtvonalon tenyésztettük. A fertőző chlamydiák mennyiségét indirekt immunfluoreszcenciával határoztuk meg. Az egerek és a sejtvonalak fertőzéséhez használt *Chlamydia* mennyiséget inklúzió formáló egység (IFU)/ml-ben adtuk meg.

3.3. Egér törzsek

A kísérleteinkhez 8-9 és 14-15 hetes nőstény ApoB100only/LDL^{-/-} (B6;129S-*Ldlr*^{tm1Her}*ApoB*^{tm2Sgy}/J) egereket és 14-15 hetes ApoE deficiens (ApoE^{-/-}, B6.129P2-*ApoE*^{tm1Unc}/J) egereket használtunk. Az egereket normál általános rágcsáló táppal vagy magas zsír és koleszterin tartalmú tápon tartottuk az első fertőzés után 12 hétig. Az állatkísérleteket a Szegedi Tudományegyetem Állatjóléti Bizottsága jóváhagyta és megfelelt az Európai Parlament 2010/63 / EU irányelvének is (engedélyszám: III./2187/2015.).

3.4. Egerek fertőzése *Cpn*-val

Az elaltatott egereket *Cpn*-val háromszor fertőztük intranazálisan kéthetes időközönként. Minden fertőzés után egy héttel és a kísérlet végén a tizenkettedik hétben plazmamintát gyűjtöttünk. További egércsoportokat is fertőztünk, ezeket az első fertőzés után 1, 4 és 9 hét elteltével áldoztuk fel.

3.5. Az egér szövetek előkészítése és az ateroszklerózis mértékének meghatározása

Az egereket az első *Cpn* fertőzés után 12 héttel áldoztuk fel. Formalinnal történő perfúzió után a szív felső részét és a leszálló aortát eltávolítottuk. Az aorta szinuszból metszeteket szövettani festésnek vetettük alá, a leszálló aortákat *in situ* hosszirányban felnyitottuk, és morfometriai analízist végeztünk rajtuk az ateroszklerózis kiterjedésének meghatározására. Aorta szinusz mintákat gyűjtöttük RNS-s izolálásra is.

3.6. RNS kivonása egér aortából és *Chlamydia* 16SrRNS meghatározása kvantitatív PCR-rel

Az összegyűjtött egér aorta mintákból teljes RNS-t vontunk ki RNS kivonó kit segítségével, majd DNázissal kezeltük, reverz transzkripcióval átírtuk cDNS-sé, majd ezt használtuk a *Cpn* 16SrRNS expresszió kimutatására qRT-PCR módszerrel.

3.7. *Cpn*-specifikus antitestek kimutatása ELISA-val

Minden fertőzés után egy héttel és a kísérlet végén begyűjtöttük az egerek plazma mintáit, majd házi ELISA teszt segítségével vizsgáltuk a *Cpn* specifikus IgG, IgM és IgA antitesteket egy korábban leírt módszer szerint.

3.8 Szérum lipoprotein analízis

Az egerek plazma mintáiban a Szegedi Tudományegyetem Orvostudományi Karán a Laboratóriumi Medicina Intézetben meghatározták a koleszterin, a trigliceridek, a HDL és az LDL-koleszterin szintjét.

3.9. Különböző sejtvonalak *C. trachomatis*-sal való fertőzése

6 lyukas lemezben növesztettük a sejteket RNS kivonás és defenzin kimutatás céljából, 96 lyukas lemezen DNS kvantitáláshoz és 24 lyukas lemezben 13mm-s fedőlemezen immunfluoreszcens festésre, és fedőlemez nélkül *Chlamydia* visszatenyésztésre. A sejteket 1 vagy 5 multiplicitással *C. trachomatis*-szal fertőztük. A fertőzött sejtek egy részét DNS kvantitálásra és visszatenyésztéshez cikloheximid tartalmú tápfolyadékban tartottuk, míg a többi esetben cikloheximid mentes tápfolyadékot használtunk. A fertőzött sejteket különböző időpontokig inkubáltuk CO₂ termosztátban 37°C-on.

A fertőzött Caco-2 vagy HeLa sejtek lizátumából a fertőzőképes *C. trachomatis* D meghatározását fedőlemezt tartalmazó lemezen növesztett McCoy sejtek fertőzésével, 48 óra után végeztük.

3.10. A fertőzött sejtek immunfluoreszcens festése a zárványok láthatóvá tételére és a visszatenyészthető *C. trachomatis* meghatározására

A fedőlemezen lévő *Chlamydia*-val fertőzött sejteket anti-cLPS, majd FITC-jelölt anti-egér IgG másodlagos ellenanyaggal festettük. A fedőlemezeket Evans blue-val festettük 1 percig. A *Chlamydia* zárványokat fotóztuk és számoltuk fluoreszcens mikroszkóppal.

3.11. Transzmissziós elektronmikroszkópia (TEM)

A sejteket lemezben növesztettük és 1 MOI *C. trachomatis*-sal fertőztük. 24 és 48 óra múlva a fertőzött sejteket mostuk és fixáltuk glutáraldehid és 1% ozmium tetroxidban. A mintákat beágyasztuk Embed 812-be (EMS, USA) rutin TEM beágyazási protokoll szerint. Az uranil-acetáttal és az ólom-citráttal végzett festés után a metszeteket Philips CM10 elektronmikroszkóppal vizsgáltuk. A képeket Olympus Soft Imagine Viewer program segítségével készítettünk el.

3.12. *C. trachomatis* DNS kvantitálása

A *Chlamydia* replikációjának mennyiségi meghatározásához egy közvetlen DNS kvantitálási eljárást követtünk. 0, 24, 48 és 72 óra elteltével a *Chlamydia*-val fertőzött sejteket megmostuk és MilliQ vizet adtunk hozzá. Két fagyasztás-olvasztás ciklust alkalmaztunk a DNS sejtekből való felszabadításához. A lizátumokat közvetlenül használtuk templátként az SsoFast™ EvaGreen® Supermix-szel történő kvantitatív PCR (qPCR)-hez. A *C. trachomatis* D genom kimutatására Pyk-primert alkalmaztunk.

3.13. RNS kivonása a fertőzött sejtekből

A génextpressziós analízishez a lemezekben lévő fertőzött sejtekből teljes RNS-t vontunk ki a GenElute Mammalian Total RNA Miniprep Kit (Sigma) segítségével a protokoll szerint a fertőzés után 2, 24, 48 és 72 órával. Az RNS mennyiséget spektrofotométerrel határoztuk meg. A kivont RNS-t DNáz kezeljük, majd cDNS-t írtunk át a qScript cDNA Supermix szintézis kittel.

3.14. *C. trachomatis* gének expressziós analízise kvantitatív RT-PCR-rel

A cDNS-t templatként használva qRT-PCR-t végeztünk PerfeCTa SYBR Green Supermix-sel CFX96 Real Time C1000 Thermal Cyclor-ben. A *16SrRNS* gén expresszióját használtuk belső standardként a *Chlamydia* gének relatív expressziójának számolásához. A *C. trachomatis* *euo*, *groEL*, *ftsK*, *omcB*, *ompA* és *pyk* transzkriptumainak relatív expresszióját értékeltük ki. „Olvasási görbe” analízist végeztük az amplifikáció specifikusságának bizonyítására. A relatív génextpressziós szinteket (RQ) a delta-deltaCt ($\Delta\Delta Ct$) érték kiszámításával adtuk meg.

3.15. hBD-2 kimutatása ELISA-val

A fertőzött sejtek felülúszóját különböző időpontban gyűjtöttük be a fertőzés után. hBD-2 termelés kimutatására a felülúszókat hBD-2 ELISA kittel teszteltük. Pozitív kontrollként *Escherichia coli* Nissle 1917 törzssel fertőzött sejtek felülúszóját használtuk.

3.16. Statisztikai analízis

Az adatokat átlagban fejeztük ki \pm a szórással (SD). SigmaPlot for Windows Version 11.0 szoftver segítségével független mintás páros t-próbát végeztünk. A különbségeket 0.05-nél kisebb *P* érték esetén tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

4. Eredmények

4.1. *Cpn*-val fertőzött ApoB100only/LDLR^{-/-} egerek

A *Cpn*-val háromszor fertőzött egerek enyhe betegség tüneteit mutatták, különösen az első fertőzés után. Az első fertőzés után az egerek felét magas zsír és koleszterin tartalmú diétán tartottuk, míg a másik fele normál rágsáló tápot kapott. A fertőzetlen egereket hasonló körülmények között tartottuk. Minden egyes fertőzött egerben ki tudtunk mutatni *Cpn*-specifikus antitestet, ami a fertőzetlenekben nem volt jelen. A normál és a magas zsír és koleszterin tartalmú diétán tartott egerekben hasonló szintű *Cpn* specifikus IgG antitestet tudtunk kimutatni (OD 0.36-0.4, 1:100 hígítás).

4.2. Ismételt *Cpn* fertőzés fokozza az ateroszklerózis fejlődését az aorta szinuszban és a leszálló aortában normál diétán tartott ApoB100only/LDLR^{-/-} egerekben

A háromszori *Cpn* fertőzés után az aterogén diétán tartott egerekben nagyon hasonló patológiát figyeltünk meg az aorta szinuszban, mint a fertőzetlenek egerekben. A normál diétán tartott egerek aorta metszeteiben az ismételt *Cpn* fertőzés hatására jelentős növekedés volt megfigyelhető az érfal plakk-kal borított felszínének hossza és a lumen plakk által elfoglalt területének méretét tekintve a hasonlóan normál diétán tartott kontroll egerekhez képest. A hosszirányban felnyitott leszálló aorta belső felszínén az ateroszklerózissal érintett területek a fertőzött állatokban jelentősen nagyobbak voltak, mint a fertőzetlen egerekben. Magas zsír és koleszterin tartalmú diétán tartott állatoknál a fertőzés nem fokozta az aorta ezen részein a léziók nagyságát.

4.3 Életképes *Cpn* kimutatása az ApoB100only/LDLR^{-/-} egerek aortájából

RT-PCR-rel vizsgáltuk a baktérium perzisztenciáját az aortában az első fertőzés után egy és négy héttel és a harmadik fertőzés után 9 és 12 héttel. Egy és négy héttel az első fertőzés után *Chlamydia* 16SrRNS expressziót tudtunk detektálni. A harmadik fertőzés után öt héttel egy aorta mintában a kettőből tudtunk metabolikusan aktív *Cpn*-t kimutatni, és a relatív expressziós szint hasonló volt, mint az első fertőzés után négy héttel kimutatott. A későbbi időpontokban nem tudtunk *Chlamydia* gén expressziót kimutatni.

4.4 Az ApoB100only/LDLR^{-/-} és az ApoE^{-/-} egerek Cpn fertőzésre hasonló kinetikával termelnek ellenanyagot

A fertőzési protokollunkat követve a nem aterogén diétán tartott ApoB100only/LDLR^{-/-} és ApoE^{-/-} egerekben vizsgáltuk a fertőzések által indukált humorális immunválaszt. A Cpn-specifikus IgG titer és az IgM és IgA antitestek szintje nem különbözött szignifikánsan a két egér törzsben.

4.5 Az ateroszklerózis mértéke hasonlóképpen növekedett a normál diétán tartott ApoB100only/LDLR^{-/-} és ApoE^{-/-} egerek aortájában Cpn fertőzés hatására

A 24-25 hetes normál diétán tartott ApoE^{-/-} egerekben jóval nagyobb, előrehaladottabb léziókat találtunk, mint az ApoB100only/LDLR^{-/-} egerekben. A nem fertőzött egerekhez képest a Cpn fertőzés hatására az ApoB100only/LDLR^{-/-} egerekben nagyobb előrehaladott plakkok és a fertőzött ApoE^{-/-} egerekben több, nekrotikus maggal rendelkező plakk jelent meg és bennük koleszterin kristályok halmozódtak fel. A leszálló aorta léziói is nagyobbak ApoE^{-/-} egerekben, mint ApoB100only/LDLR^{-/-} egerekben. Amikor a Cpn fertőzés hatását vizsgáltuk szignifikáns növekedést találtunk a mért értékekben. Az aorta szinuszban az érfal plakk-kal borított felszínének hossza és az aorta lumenben plakk által elfoglalt terület nagysága és a leszálló aorta plakk méretei növekedést mutattak: az ApoB100only/LDLR^{-/-} egerekben 2,08-szorosára, 1,7-szeresére, 2,5-szeresére nőtt, ApoE^{-/-} egerekben 2,04 szeres, 1,32-szerese, 2,56-szorosa volt.

4.6. Plazma lipid szint ApoB100only/LDLR^{-/-} és ApoE^{-/-} egerekben

Minden időpontban a fertőzés állapotától függetlenül az ApoE^{-/-} egerekben magasabb volt a totál koleszterol és az LDL szintje, mint az ApoB100only/LDLR^{-/-} egerekben, a triglicerid és a HDL koncentráció magasabb az ApoB100only/LDLR^{-/-} egerekben az ApoE^{-/-} egerekhez hasonlítva. Csak a harmadik Cpn fertőzés eredményezett szignifikáns trigliceridszint emelkedést ApoE^{-/-} egerekben. Az ApoB100only/LDLR^{-/-} egerekben nem volt megfigyelhető fertőzéssel összefüggő változás a triglicerid szintben. A fertőzéssel kapcsolatos jelentős LDL-szint emelkedés csak az ApoB100only/LDLR^{-/-} egerekben volt az első fertőzés hatására. Nem találtunk fertőzéssel kapcsolatos HDL-szint változást.

4.7. Chlamydia növekedés detektálása immunfluoreszcens festéssel Caco-2 és hagyományos gazdasejtekben

Indirekt immunfluoreszcens festés után *C. trachomatis* zárványok voltak megfigyelhetők a Caco-2 és a HeLa sejtekben. A zárványok kimutatása mindkét sejt típusban a folyamatos replikációt jelzett, azonban a zárványok morfológiája eltérő növekedési kinetikára utalt a különböző sejt típusokban. A 48 órás Caco-2 sejtekben a zárványok nagyok voltak, de a permisszív HeLa sejtekben a kiterjedt fluoreszkáló terület a replikációs ciklus végső szakaszát jelezte.

4.8. Chlamydia fertőzött Caco-2 és hagyományos sejtek transzmissziós elektron mikroszkópos (TEM) vizsgálata

Caco-2 sejtekben TEM-el vizsgálva a *C. trachomatis* D zárványok meglehetősen heterogén képet mutattak a fejlődési stádium tekintetében 48 órával a fertőzés után, azonban HeLa sejtekben teljesen fejlett, sok EB-t tartalmazó zárvány volt látható.

4.9. Chlamydia genom szaporodása a Caco-2 és a hagyományos gazda sejtben

A Caco-2 és a HeLa sejtekben a *Chlamydia* genom szaporodását egy új DNS kvantitáló módszerrel követtük a 3 napos tenyésztési periódus alatt. A qPCR-rel detektált *C. trachomatis* *pyk* gén mennyiségének növekedését a 0 órás fertőzött mintához viszonyítva számoltuk ki. A *C. trachomatis* genom a Caco-2 sejtekben hasonló mértékű szaporodást mutatott 72 órára, mint a HeLa sejtekben. A Caco-2 sejtekben a replikáció kinetikája elnyújtottabb lefolyást mutatott.

Cikloheximid mentes tápfolyadékban tenyésztve a hozam mindkét féle sejtben alacsonyabb volt. A Caco-2 sejtekben a cikloheximid jelenléte nem okozott jelentős változást a replikáció lefolyásában, ellentétben a HeLa sejtekben megfigyelttől.

4.10. Fertőzőképes *Chlamydia* keletkezése a Caco-2 és a hagyományos gazdasejtben

A visszatenyészthető életképes *Chlamydia*-t, úgy határoztuk meg, hogy az ultrahangozott fertőzött sejteket a tápfolyadékukkal együtt McCoy sejtekre oltottuk le. A visszanyert fertőző *Chlamydia* azt mutatja, hogy a teljes replikációs ciklus végbemegy a Caco-2 sejtekben. A *C. trachomatis* növekedése kissé késleltetett a Caco-2 sejtekben, de 72 óra után a fertőzés után hasonló mennyiségű *C. trachomatis*-t tudtunk a Caco-2 sejtekből és a HeLa sejtekből kitenyészteni.

4.11. A kiválasztott *Chlamydia* gének transzkripciós mintázata a Caco-2 és a hagyományos gazdasejtben

Néhány kiválasztott *C. trachomatis* gén expressziójának kinetikáját vizsgáltuk Caco-2 sejtekben 3 napos időszak alatt a HeLa sejtekkel összehasonlítva. A gének relatív expresszióját a *16SrRNA* expresszió szintjéhez normalizáltuk. A fertőzés után 24 órával a korai gén klaszterbe tartozó *euo* relatív expressziója jóval alacsonyabb volt HeLa sejtekben, mint a Caco-2-ben, és megnövekedett a későbbi időpontokban, amikor a replikáció alacsonyabb szinten volt. A Caco-2 sejtekben 24 óra után az *euo* expressziós szintje csökkent párhuzamosan a folytatódó replikációval. A *C. trachomatis* *D pyk*, *ompA*, *ftsK* és *omcB* gének expressziója hasonló tendenciát mutat mindkét vizsgált sejtben, de a relatív expressziós szint magasabb volt Caco-2 sejtekben, mint HeLa sejtekben. Az *ompA* gén expressziós szintje 24 óránál volt a legmagasabb, és a Caco-2-sejtekben hosszabb ideig maradt magas szinten, mint a HeLa sejtekben. A *ftsK* gén expressziójának legmagasabb szintje a fertőzést követő 24 órában volt megfigyelhető a gyakori osztódás idejében, és a Caco-2 sejtekben a későbbi időpontokban is magas szinten maradt. A késői gén *omcB* expressziója 48 órával a fertőzés után tetőzött és a Caco-2 sejtekben magasabban, mint a HeLa sejtekben.

Folyamatosan magas relatív szintű *groEL* transzkripciót figyeltünk meg Caco-2 sejtekben, beleértve a korai időpontot, a 24 órát is. A génexpressziós értékek további elemzése azt mutatja, hogy a Caco-2 sejtekben a HeLa sejtekhez képest elnyújtott, hosszabb replikációs ciklus figyelhető meg a Caco-2 sejtekben magasabb korai (24 óra) és csökkenő késői (72 óra) *euo* expresszióval, magasabb osztódással kapcsolatos fehérje (*ftsK*) és membrán fehérje (*ompA*, *omcB*) gén expresszióval a késői időpontokban. Kimagasló volt a *groEL* gén transzkripciója a Caco-2 sejtekben, különösen a fertőzés után 24 órával.

4.12. *C. trachomatis* HBD-2 indukáló képessége a Caco-2 sejtekben

Megvizsgálták, hogy a *C. trachomatis* képes-e hBD-2 antimikrobiális peptid termelését indukálni Caco-2 sejtekben. A hBD-2 fehérje nagymennyiségben volt kimutatható az *E. coli* Nissle stimulált kontroll Caco-2 sejtek felülűszójában, a csúcst 48 órával a kezelés után érte el. A *C. trachomatis* D-vel fertőzött sejtekben a hBD-2 termelés hasonló időgörbét mutatott, azonban lényegesen alacsonyabb szintű volt, mint a Nissle stimuláció esetében.

5. Következtetés

5.1. Célkitűzés 1:

Az ApoE^{-/-} egereket gyakran használják az ateroszklerózis állatmodelljeként, azonban ennek az egértörzsnak a lipidmetabolizmusa különbözik a hipercholesterolémiában szenvedő emberektől. Az ApoE^{-/-} egerek plazmája nagy mennyiségben tartalmaz ApoB48-at tartalmazó

lipoproteint a nagyon alacsony sűrűségű lipoprotein (VLDL) osztályból, míg az ateroszklerózisban szenvedő emberekben szinte mindig a koleszterolban gazdag ApoB100 tartalmú LDL plazmaszintje magas. A legtöbb közlemény, ami *Cpn* és az ateroszklerózis kapcsolatát vizsgálta, ezt a modellt alkalmazta, hogy tisztázza a *Cpn* fertőzés és az ateroszklerózis összefüggésének jellegét, és szerepét betegség beindításában és/vagy súlyosbításában. Azt állították, hogy a *Cpn* fertőzés az ateroszklerózist a hiperlipidémiával együttműködve súlyosbítja, azonban az ApoE hiánya befolyásolhatja a kórokozó elleni immunválaszt, és fokozott ellenállást figyeltek meg ezekben az egerekben a vaszkuláris fertőzéssel szemben. Célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk az ismételt *Cpn* fertőzés hatását az ateroszklerotikus plakkok kialakulására ApoB100only/LDLR^{-/-} egér törzsből, a lipoprotein rendellenesség egy másik egérmódeljében, amelyek az emberi familiáris hiperkoleszterinémia legpontosabb modelljének tekinthető.

Az ApoB100only/LDLR^{-/-} egér törzset olyan genetikai módosítással hozták létre, ami eredményeként a plazma koleszterinjének nagy része az ApoB100 tartalmú LDL-ben található, és alacsony zsírtartalmú normál diétán is ateroszklerózis alakul ki bennük. Először azt akartuk megállapítani, hogy az ApoB100only/LDLR^{-/-} egerek alkalmasak modellek-e a *Cpn* ateroszklerózisban betöltött szerepének vizsgálatára. Ezért az egércsoportokat normál vagy magas zsír és koleszterin tartalmú táppal etettük, és ismételten fertőztük *Cpn*-vel vagy fertőzetlenül hagytuk őket, és követtük az ateroszklerózis kialakulását. Kísérleteink azt mutatták, hogy a normál étrenden tartott ApoB100only/LDLR^{-/-} egerekben a háromszori *Cpn* fertőzés fokozott ateroszklerózis fejlődést eredményezett az aorta szinuszban és a leszálló aortában. Ezt a hatást nem figyeltük meg a magas zsír és koleszterin tartalmú táppal etetett állatokban. Úgy tűnik, hogy a hiperlipidémia hatását ApoB100only/LDLR^{-/-} egerekben *Cpn* fertőzés tovább súlyosbítja, de magas zsír és koleszterin tartalmú diéta mellett nem okoz további ateroszklerózis súlyosbodást. Mindazonáltal a baktérium befolyásolta az ateroszklerosis folyamatát, jelezve, hogy az ApoB100only/LDLR^{-/-} egerek alkalmasak további kutatásra. Eredményeink összhangban vannak korábbi tanulmányok eredményeivel, ahol a *Cpn* fertőzés ateroszklerózis fokozó hatását leírták normál diétán tartott ApoE^{-/-} egerekben is. Azonban az ateroszklerózis súlyosbodott olyan ApoE^{-/-} egerekben is, amelyeket magas zsírtartalmú diétán tartottak és egyszer vagy háromszor *Cpn*-vel fertőztek.

Feltételeztük, hogy az ApoB100only/LDLR^{-/-} és az ApoE^{-/-} egerek közötti genetikai különbség alapján, hogy a *Cpn* fertőzés vagy ateroszklerózis jellemzői is eltérőek lehetnek, ezért összehasonlítottuk a fertőzés hatását ebben a két egértörzsből. A modellünkben a fertőzés sikerességét a *Cpn*-specifikus IgG, IgA és IgM ellenanyagok kimutatásával bizonyítottuk. Amikor az IgG antitest szintjét hasonlítottuk össze, az ApoB100only/LDLR^{-/-} és ApoE^{-/-} egerek között szignifikáns különbség nem volt megfigyelhető. Korábban kimutatták, hogy az ApoE^{-/-} egerek több *Cpn*-specifikus antitestet termeltek, mint a vad típusú egerek, amit az ApoE hiányával hoztak összefüggésbe. Eredményeink nem támasztják alá ezt, tekintve, hogy az ApoB100only/LDLR^{-/-} egerekben az ismételt *Cpn* fertőzés magas szintű antitest termelést eredményezett az ApoE hiánya nélkül.

Az aorta mintákból metabolikusan aktív *Cpn*-t tudtunk kimutatni az első fertőzés után 9 héttel. Korábbi kutatások a baktérium izolálásával mutatták ki a *Cpn* jelenlétét az ismételten fertőzött ApoE^{-/-} egerek aortájában a fertőzés után két héttel. Továbbá későbbi időpontokban PCR-rel amplifikálták a baktérium DNS-ét. Irodalmi adatok szerint számos bizonyíték utal arra, hogy a *Cpn* képes tartós fertőzést tud létrehozni *in vivo*. Eredményeink további információt szolgáltatnak a *Cpn* perzisztenciájáról, mivel a *16SrRNA* gén transzkripciója arra utal, hogy metabolikusan aktív baktériumok, nem csak a le nem bomló DNS vagy antigén vannak jelen az aortában az ismételt fertőzések után. Az életképes *Chlamydia* hosszú távú jelenléte néhány fertőzött egér aorta szövetében hozzájárulhat a fertőzés aterogén hatásához.

A 12 hetes megfigyelési időszak végén a nőstény ApoE^{-/-} egerekben azonos életkorban súlyosabb volt az ateroszklerózis, mint az ApoB100only/LDLR^{-/-} egerekben. Mindazonáltal az ApoE^{-/-} egerekben, az ApoB100only/LDLR^{-/-} egerekhez hasonlóan, a fertőzés fokozott plakk fejlődést eredményezett anélkül, hogy az egereket magas zsírtartalmú táppal etették volna.

Leírták, hogy a *Cpn* megbontja a zsírsav-egyensúlyát a lipid metabolizmust szabályozó gének befolyásolásával a májban, megváltoztatja a makrofágok koleszterin homeosztázisát, azonban a legtöbb vizsgálat nem mutatott ki jelentős változást az egerek plazma lipidprofiljában *Cpn* fertőzés után. Egyesek megnövekedett triglicerid koncentrációt detektáltak az ismételt fertőzés után ApoE^{-/-} egerekben, hasonlóan a mi eredményeinkhez. Az ApoB100only/LDLR^{-/-} egerek első fertőzés utáni LDL szintjének emelkedése a primer fertőzés okozta gyulladásnak is tulajdonítható. Eredményeink összhangban vannak korábbi adatokkal, melyek összefüggést mutattak ki a krónikus *Cpn* fertőzés és a szívkoszorúér megbetegedés fokozott kockázata között familiáris hiperkoleszterinémiában szenvedő betegekben.

5.2. Célkitűzés 2:

Ebben a tanulmányban a human bél eredetű Caco-2 sejtekben vizsgáltuk a *Chlamydia trachomatis* fertőzés morfológiai és molekuláris jellemzőit. Azért választottuk ezt a sejtvonalat a vizsgálatainkhoz, mert az enterociták jellemzőit mutatja, és számos a közelmúltban publikált tanulmány hipotézise az, hogy a *Chlamydia* tud perzisztálni a gasztrointesztinális traktusban, és a fertőzött gasztrointesztinális traktus a genitáliák újra fertőződésének forrása lehet. Továbbá, hogy a *C. trachomatis* szerepet játszhat a GI traktus megbetegedésében. Mivel a gasztrointesztinális traktus hámsejtjei a természetes immunválasz részeként β -defenzin-2 termeléssel válaszolnak fertőzésre, ezért vizsgáltuk *C. trachomatis* defensin indukáló képességét Caco-2 sejtekben.

Az immunfluoreszcens festéssel és elektronmikroszkópiával láthatóvá tett *C. trachomatis* D zárványok a Caco-2 sejtekben hasonló, de hosszabb replikációs ciklusra mutattak, mint a HeLa sejtekben. A *Chlamydia* lassabb szaporodását az is mutatta, hogy a Caco-2 sejtekben 48 órával a fertőzés után kisebb mennyiségű genomot és fertőzőképes *Chlamydia*-t találtunk. Azonban a fertőzés után 72 órával az értékek hasonló mértékű *Chlamydia* replikációt mutattak a két sejtvonalban. Ezek az eredmények azt a következtetést engedik levonni, hogy ennek az emberi genitális *Chlamydia* törzsnek a Caco-2 sejtek növekedést elősegítő környezetet biztosítanak. Abban az esetben, ha a gazdasejtek tápfolyadékát cikloheximiddel egészítettük ki, a *Chlamydia* replikációs ciklus számára optimális körülmények zajlott, ahol a gazdasejt fehérje szintézise kevésbé befolyásolja a baktérium növekedését. Amikor a cikloheximid kimaradt a tápfolyadékból, a *Chlamydia* genom felszaporodása alacsonyabb szintet ért el, és korai csökkenést mutatott a HeLa sejtekben, de ez volt kifejezett a Caco-2 sejtekben. A génexpressziós vizsgálatokat cikloheximid nélkül végeztük, amikor a természetes sejt környezet érvényesül.

Korábbi tanulmányokban szerint a *Chlamydia* fejlődési ciklusa transzkripciós szinten szabályozott. A transzkripciós profil változását *in vitro* modellekben mutatták ki, ahol a különböző hatások (IFN- γ , penicillin) a *Chlamydia* perzisztens növekedési formáját indukálták. Bizonyos sejttípusok nem bizonyultak permisszívnek a normál *Chlamydia* növekedéshez, és a transzkripciós mintázat alapján a fertőzés perzisztens formája megy végbe ezekben a sejtekben. Mivel a Caco-2 sejtekben eltérő növekedési kinetikát figyeltünk meg az optimális *in vitro* gazdasejtbelihez képest, ezért összehasonlítottuk a *C. trachomatis* gének expresszióját a Caco-2 sejtekben és a HeLa sejtekben. Néhány kiválasztott gén, amelyek a replikációs ciklus korai (*euo*), középső (*ompA*, *groEL*, *pyk*) és késői stádiumát (*omcB*) reprezentálják és a sejtosztódáshoz kapcsolt *ftsK* gén expressziós szintjét elemeztük, és a *16SrRNS* gén expressziós szintjéhez normalizáltuk. Az *euo* gén termékét a késői gének szupresszoraként írták le, ennek a génnek a csökkent expressziója magyarázhatja a Caco-2 sejtekben az EB-k membránfehérjéjét

tekintetében jobban hasonlítanak hiperkoleszterinémias emberekhez - fokozódott az ateroszklerózis fejlődése a *Cpn* fertőzés hatására, ezért ez az egér törzs alkalmas modellje lehet a fertőzéssel összefüggő ateroszklerózis fokozódás vizsgálatának és további bizonyítékot szolgáltat a *Cpn* fertőzés proatherogén hatására egerekben.

C. trachomatis a szem, az urogenitális traktus és a légutak fertőzését okozza. Ez a baktérium a leggyakrabban azonosított szexuális úton terjedő kórokozó. A tünetmentes, ismétlődő és krónikus *C. trachomatis* fertőzés gyakori az urogenitális traktusban, és súlyos reprodukció okozhat. A fertőzés állat modelljei és az epidemiológiai vizsgálatok azt sugallják, hogy a GI traktusban tartózkodó *Chlamydia* lehet az ismételt urogenitális fertőzések forrása.

Ezért tanulmányoztuk a *C. trachomatis* urogenitális traktusban betegséget okozó szerovariánsának szaporodási tulajdonságait a human bél epitheliális Caco-2 sejtben, és vizsgáltuk a sejtek fertőzés által indukált defenzin termelését. Az immunfluoreszcens festés és a transzmissziós elektronmikroszkópia *Chlamydia* zárványok jelenlétét mutatta a sejtekben. Hasonló mennyiségben mutattunk ki *Chlamydia* DNS-t és életképes *C. trachomatis*-t Caco-2 sejtekben, mint a baktérium *in vitro* szaporítására általánosan használt gazdasejtben. A kiválasztott *C. trachomatis* gének kifejeződésének kinetikája elnyújtott szaporodási ciklusra utal Caco-2 sejtekben, amit a késői gének és a hősokk protein *groEL-1* gén tartósan magas szinten való kifejeződése jelez. A *C. trachomatis* szaporodása alacsony szintű β -defensin-2 termelést váltott ki Caco-2 sejtekben, ami hozzájárulhat ahhoz, hogy a baktérium elkerülje a bélcsatornában működő immunrendszer általi felismerést. Eredményeink szerint a Caco-2 alkalmas gazdasejt a *C. trachomatis* szaporodásához, tehát a GI traktus a *C. trachomatis* baktérium tartózkodási helye lehet.

A következő eredmények tekinthetők újnak

- Az ApoB100only/LDLR^{-/-} egértörzs egy másik/további egér modell a lipid rendellenességek vizsgálatára, az ismételt *Cpn* fertőzés fokozó hatással rendelkezik az ateroszklerotikus plakk képződésére.
- *Cpn* fertőzött ApoB100only/LDLR^{-/-} egerekben az ateroszklerózis fejlődés fokozódását figyeltünk meg a normál diétán tartott állatokban, de nem a magas zsír és koleszterin tartalmú diétán tartottakban
- Metabolikusan aktív *Cpn* mutattunk ki aorta mintákból RT-PCR módszerrel
- A Caco-2 sejtek növekedést elősegítő környezetet biztosítanak az emberi genitális *C. trachomatis* törzs számára.
- A *C. trachomatis* D növekedési tulajdonságai a Caco-2 sejtekben azt mutatták, hogy a *Chlamydia* törzsnek hosszú távú replikációs ciklusa van a HeLa hagyományos gazdasejtekéhez képest.
- A *C. trachomatis*, a hő sokk proteint (Groel-1)-et kódoló *groEL* génje a Caco-2 sejtekben a megfigyelési időszak alatt nagymértékben upregulálódott, ami a stresszes növekedési környezet jele lehet.
- A Caco-2 sejt vonalban a *C. trachomatis* fertőzés mérsékelt szinten indukálta a hBD-2 termelést, amely lehet a baktériumok immun kitérő mechanizmusa.

8. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, aki segítettek és inspiráltak a Ph.D tanulmányaim során.

Különösen a következő embereket szeretném megemlíteni:

Endrész Valériának Ph.D., a témavezetőmnek a sok tudásért, amit megosztott velem. Ezen dolgozat nem születhetett volna meg az ő segítségével és támogatása nélkül.

Prof. Dr. Mándi Yvettnek Professor Yvette Mándi, az Interdiszciplináris Orvostudományi Doktori Iskola vezetőjének, és az Orvosi Mikrobiológiai és Immunobiológiai Tanszék korábbi vezetőjének és **Burián Katalinnak**, a jelenlegi tanszékvezetőnek a támogatását és a megfelelő munka körülményeket.

Szeretnék köszönetet mondani az összes **Ph.D. a hallgatónak**, hogy nagyszerű munkahelyi hangulatot teremtettek.

Az Orvosi Mikrobiológiai Tanszék **minden munkatársának** hálásan köszönetet mondok a támogató és kellemes környezet megteremtéséért.

Köszönöm az asszisztenseknek **Lévai Istvánnénak, Ürmös Kittinek and Urbán Szilviának** a kiváló technikai munkát **Krisztián Daru** hisztotechnológiai és **Rázga Zsoltnak** a elektronmikroszkópos munkájáért.

Minden **Barátomnak**, mert mindig ott voltak mellettem.

A **Családomnak** és a **Szerelmemnek**, akik mindig támogattak, biztattak és hittek bennem.

Ezen disszertációt **Anyukámnak** és **Apukámnak** ajánlom.

Ezen tanulmányt támogatta a Thrombosis Research Institute, London, UK; és a Human Resources Development Operational Programme EFOP-3.6.1-16-2016-00008.

A disszertáció alapját képező irodalmak:

- I. **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, Article ID 8325915
Impact factor: 2.476
- II. **Lantos I**, Virok DP, Mosolygó T, Rázga Z, Burián K, Endrész V Growth characteristics of *Chlamydia trachomatis* in human intestinal epithelial Caco-2 cells Pathog Dis. 2018 April 1;76(3)
Impact factor: 2.337

A Tézishez nem kapcsolódó közlemények:

- I. Bogdanov A, Janovák L, **Lantos I**, Endrész V, Sebők D, Szabó T, Dékány I, Deák J, Rázga Z, Burián K, Virok DP: Non-Activated Titanium-Dioxide Nanoparticles Promote the Growth of *Chlamydia trachomatis* and Decrease the Antimicrobial Activity of Silver Nanoparticles. J Appl Microbiol. 2017 November 123(5):1335-1345
Impact factor: 2.099
- II. Eszik I, **Lantos I**, Önder K, Somogyvári F, Burián K, Endrész V, Virok DP: High dynamic range detection of *Chlamydia trachomatis* growth by direct quantitative PCR of the infected cells. J Microbiol Methods. 2016 January;120:15-22.
Impact factor: 1.790
- III. Xia M, Chen D, Endresz V, **Lantos I**, Szabo A, Kakkar V, Lu X Modulation of recombinant antigenic constructs containing multi-epitopes towards effective reduction of atherosclerotic lesion in B6;129S-Ldlr^{tm1Her}Apob^{tm2Sgy}/J mice. PLOS ONE 2015 April 1;10(4):e0123393.
Impact factor: 3.534

- IV. Bogdanov A, Endrész V, Urbán S, **Lantos I**, Deák J, Burián K, Önder K, Ayaydin F, Balázs P, Virók DP. Application of DNA chip scanning technology for automatic detection of *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia pneumoniae* inclusions. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(1):405-13.
Impact factor: 4.48

A tézishez kapcsolódó absztraktok:

1. **Lantos I**, Mosolygó T, Virók DP, Burián K, Endrész V: *Chlamydia pneumoniae* infection accelerates atherosclerosis development in "ApoB100only/LDLR^{-/-}" and ApoE^{-/-} mouse strains in different manner. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2014. évi Nagygyűlése és EU FP7 PROMISE Regional Meeting: Absztrakt füzet. 82 p. Keszthely, Magyarország, 2014.10.15 -17. Magyar Mikrobiológiai Társaság, p. 37
2. **Lantos I**, Eszik I, Virók DP, Mosolygó T, Burián K, Endrész V: Intestinal Caco-2 cells support chlamydia replication and produce Human Beta-Defensin-2. 17th International Congress Of The Hungarian Society For Microbiology Eötvös Loránd University Convention Centre, Budapest, Hungary 8-10 July, 2015
3. Eszik I, **Lantos I**, Somogyvári F, Önder K, Burián K, Endrész V and Virók DP
Development of a QPCR based method for the quantitative measurement of *Chlamydia trachomatis* growth. 17th International Congress Of The Hungarian Society For Microbiology Eötvös Loránd University Convention Centre, Budapest, Hungary 8-10 July, 2015

A Tézishez nem kapcsolódó absztraktok:

1. **Lantos I**, Bogdanov A, Endrész V, Urbán Sz, Deák J, Burián K, Önder K, Balázs P, Virók DP. Application of DNA chip scanning technology for the automatic detection of *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia pneumoniae* inclusions. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 60:(Suppl. 1.) pp. 173-174. (2013) 4th Central European Forum for Microbiology. Keszthely, Magyarország: 2013.10.16-18.
2. Burián K, Eszik I, **Lantos I**, Bogdanov A, Endrész V and Virók DP: Impact of interferon-gamma on the gene expression of human epithelial cells. 17th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology Eötvös Loránd University Convention Centre, Budapest, Hungary 8-10 July, 2015
3. Burián K, Mosolygó T, Boros É, Bogdanov A, Nagymihály M, Horváth B, Endrész V, **Lantos I**, Kondorosi É, Virók DP and István Nagy. Impact of *Chlamydia trachomatis* infection and interferon-gamma treatment on the human polymorphonuclear leukocyte transcriptome 17TH International Congress of the Hungarian Society for Microbiology Eötvös Loránd University Convention Centre, Budapest, Hungary 8-10 July, 2015
4. Varga-Bogdanov A, Ildikó **Lantos I**, Eszik I, Balázs P, Deák J, Burián K, Endrész V and Virók DP. Detection of *Chlamydia trachomatis* attachment to epithelial cells by the chlamycount software using images produced by a DNA-chip scanner. 17th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology Eötvös Loránd University Convention Centre, Budapest, Hungary 8-10 July, 2015
5. Kovács N, **Lantos I**, Endrész V, Berkecz R. Lipidomic approach to identify patterns in phospholipid profiles in atherosclerosis in ApoE deficient mice infected with *Chlamydia pneumoniae*. 21st International Symposium On Analytical And Environmental Problems, University of Szeged, Department of Inorganic and Analytical Chemistry Szeged, Hungary September 28, 2015

6. Xia M, Endresz V, **Lantos I**, Szabo A, Mundkur L, Kakkar V and Lu X. Adoptive transfer of antigen-induced specific regulatory T cells (TREG) protects against atherosclerotic lesion formation in B6;129S-Ldlr^(tm1her)Apob^(tm2sgy)/J mice. XXV. Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Toronto, Canada June 20–25, 2015
7. Xia M, Endresz V, Chen D, **Lantos I**, Szabo A, Mundkur L, Kakkar V and Lu X. Modulation of recombinant antigenic constructs containing multi-epitopes towards effective reduction of atherosclerotic lesion in B6;129S-LDLR^(tm1Her)Apob^(tm2Sgy)/J mice. XXV. Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Toronto, Canada June 20–25, 2015
8. Xia M, Endresz V, **Lantos I**, Szabo A, Mundkur L, Kakkar V and Lu X. Swapping over two peptide epitopes derived from APOB and C5AR located at terminuses of recombinant proteins maintains the similar effective reduction on atherosclerotic lesion in B6;129S-LDLR^(tm1Her)Apob^(tm2Sgy)/J mice. XXV. Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Toronto, Canada June 20–25, 2015
9. Xia M, Chen D, Endresz V, **Lantos I**, Szabo A, Mundkur L, Kakkar V and Lu X. Two peptide epitopes derived from human and mycobacterium, respectively, reduce atherosclerotic lesion in B6;129S-LDLR^(tm1Her) Apob^(tm2Sgy)/J mice. XXV. Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Toronto, Canada June 20–25, 2015
10. Burián K, Mosolygó T, **Lantos I**, Rafai T, Bogdanov A, Klivényi P, Endrész V, Virók DP. A *Chlamydia muridarum* fertőzés, ellentétben a korábbi in vitro kísérletek eredményeivel, indukálja az indolamin2,3-dioxigenáz termelését balb/c egerek tüdejében. A Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése és a XII. Fermentációs Kollokvium 2016. október 19-21. Helikon Hotel, Keszthely