

ChlamyTrans szakmai beszámoló

Az ERA-NET Pathogenomics pályázat magyar csoportjának fő kutatási célja az volt, hogy a *Chlamydia pneumoniae* és/vagy *Chlamydia trachomatis* fertőzés során folyó Chlamydiális génexpressziót mérje *in vivo* mintákon. Az *in vivo* mintákon végzett génexpresszió azért rendkívül fontos mert az *in vivo* környezet, a fertőzés helyén generált cytokin kaszkád, glükóz limitáció, oxigéntenzio csökkenés együttese olyan hatással lehet a Chlamydiát tartalmazó gazdasejtre, és ezen keresztül a baktériumokra amelyek egy speciális, *in vitro* környezetben nem modellezhető génexpressziós aktivitással járnak. Ezen *in vivo* környezetben expresszált gének lényeges virulenciafaktorok, fontos vakcina és gyógyszer-célpontok lehetnek.

Az ilyen génexpressziós mérésekhez használt, a klinikai mintából vagy állatmodellből származó RNS limitált mennyisége miatt egy, a Chlamydiális mRNS-eket - azok összességét - felsokszorozó, amplifikáló eljárás kidolgozása is feladat volt. Végül, olyan gazdasejti gének azonosítása is feladatunk volt, amelyek részt vehetnek a Chlamydiális betegségek által indukált szöveti szintű gyulladásban és remodellingben.

A munkatervben szereplő fő célkitűzések:

Egy olyan RNS amplifikációs módszer kidolgozása, amellyel *in vivo* mintákból származó totál RNS-t felhasználva nagy szenzitivitással és specificitással tudunk Chlamydiális RNS-t kimutatni.

Chlamydiális génexpressziót kimutatása állatmodellből, illetve humán klinikai mintákból származó RNS-ekben.

A fentebb említett transzkriptom szintű génexpressziós vizsgálat alapján azon gének kiválasztása, amelyek preferenciálisan expresszálódnak *in vivo* körülmények között. Ezen gének expressziójának QPCR-es igazolása. Ezen redukált géncsoport szolgálhat alapul egy specifikusabb *in vivo* diagnosztikus kit alapjául.

Olyan gazdasejti gének azonosítása, amelyeknek szerepe lehet a Chlamydiális fertőzések szöveti patológiájának kialakításában.

A munkatervben vállalt feladatoktól való eltérés okai:

A megfelelő RNS amplifikációs módszer megválasztása a vártnál jóval bonyolultabb lett, és a munkatervben is csúszást okozott. Eredetileg gyári kiteket használtunk a totál RNS minták megtisztítására (gazdasejti rRNS és mRNS eltávolítása, Chlamydiális rRNS eltávolítása, Chlamydiális mRNS amplifikáció). A probléma az volt, hogy a gyári specifikációkkal nem, de az eddigi leírt RNS tisztítási irodalommal egyezően [1] a hibridizációs alapú rRNS és mRNS eltávolítás alacsony hatásfokúnak bizonyult. A bakteriális mRNS amplifikációra használt gyári kit viszont relatíve nagy mennyiségű totál RNS-t igényelt és e mellett az amplifikáció hatásfoka alacsony volt. A gyári eljárásokat elvetve egy saját RNS amplifikációs módszert dolgoztunk ki, ami azon a komparatív előnyön alapszik, hogy az osztrák ChlamyTrans partner a Chlamydiális gének klónozásához beszerezte az összes *C.pneumoniae* és *C. trachomatis* specifikus primert. Ezen primerek segítségével sikerült kidolgozni egy magas szenzitivitású és specificitású chlamydiális RNS amplifikációt.

A kidolgozott amplifikációs módszert *C. trachomatis* PCR pozitív klinikai mintákon szándékoztunk alkalmazni. Azonban a finn partnertől kapott méhnyaktörlés mintákból származó RNS annyira kevés volt, hogy még a kidolgozott nagy érzékenységű amplifikációs

módszerrel sem tudtuk felamplifikálni. Ezért, a pályázatban is lefektetett elvek szerint állatmodellben kutattunk tovább, és *C. pneumoniae*-val fertőzött egértüdőkben vizsgáltuk a Chlamydiális génexpressziót. Eltérés még az előzetes tervektől az, hogy a génexpressziót nem DNS-chip vagy újgenerációs szekvenálási módszerrel vizsgáltuk, hanem a ma még nemzetközileg is rendkívül ritkán használt módszert vezettünk be, teljes genom QPCR-t végeztünk. Azaz összesen közel 1000 különálló QPCR-t végeztünk mintánként *C. pneumoniae* génspecifikus primerrel. Ezzel, az amplifikáció mellett sikerült egy újabb nagyérzékenységű módszert bevezetnünk a génexpressziós vizsgálatokba.

Azon speciális gazdasejti gének genomi vizsgálata, amelyek hajlamossá tehetnek egy pl. *C. trachomatis* fertőzés által indukált szöveti patológia kialakulására az osztrák partner laboratóriumában még folyik (az osztrák társfinanszírozás 8-9 hónapos késéssel indult). Mindazonáltal, a magyar pályázat részeként kettő, a teljes gazdasejti génexpresszióváltozást vizsgáló kísérletet végeztünk, amelyek olyan gazdasejti géneket azonosítottak, amelyek részt vehetnek a Chlamydia fertőzés leküzdésében illetve a gyulladás indukációjában.

Kutatási eredmények

Chlamydia specifikus mRNS amplifikáció kidolgozása és genom szintű génexpresszió vizsgálata *in vivo*

A pályázat fontos célja volt egy olyan RNS amplifikációs módszer kidolgozása, amellyel *in vivo* mintákból származó totál RNS-t felhasználva nagy szenzitivitással és specificitással tudunk Chlamydiális RNS-t kimutatni. A ChlamyTrans pályázatnak megfelelően, olyan már kidolgozott gyári módszerekkel próbálkoztunk először, amelyek megfelelőnek tűntek a Chlamydiális mRNS specifikus amplifikációjára. Első kísérleteink során hibridizációs és enzimikus módszereket, illetve ezek kombinációját próbáltuk ki a nem kívánt RNS populációk eltávolítására. A kezelt és a kontroll mintákat SOLID újgenerációs szekvenálásnak vetettük alá. Azt az eredményt kaptuk, hogy ezek a módszerek, önállóan vagy kombinációban a bakteriális és humán rRNS csak egy kis részét távolítják el. A SOLID RNS szekvenálás nagy részében tehát riboszómális RNS-ek szekvenciáit kaptuk vissza. Ezzel párhuzamosan a Chlamydiális RNS-ek amplifikációját is beállítottuk már leírt protokollok alapján. Azt az eredményt kaptuk, hogy a SMART amplifikáció megfelelő hatékonysággal működött egyes chlamydiális géneknél, de sajnos nem mindegyiknél. Az Eberwine amplifikációs protokoll viszont alacsony 300-500 szoros amplifikációt eredményezett, ami nem tűnt elegendőnek *in vivo* minták analíziséhez. Ezért ezeket a módszereket mellőzve, egy új amplifikációs módszert fejlesztettünk ki.

A módszer kifejlesztésére és optimalizálására *C. pneumoniae*-val fertőzött HeLa sejteket használtunk. Az RNS amplifikáció első lépésében a fertőzött mintából totál RNS-t vontunk ki, majd reverz transzkripciót (RT) végeztünk. Az RT során az osztrák partnertől kapott génspecifikus primerek reverz tagjából egy mixet képeztünk, és ezzel a mixtel végeztük az RNS átírását. Fontos megemlíteni, hogy mivel ezek a primerek klónozó primerek voltak eredetileg, mindegyik primeren egy univerzális TAG volt. A RT-t olyan enzimmekkel végeztük (SuperScript-III, MaxiScript), amelyek magas hőfokon (55°C) képesek az mRNS átírására. A keletkezett cDNS-t egy olyan PCR reakcióban amplifikáltuk, amelyben a génspecifikus primerek forward tagjából képeztünk mixet és egy TAG specifikus primert használtunk. Az amplifikáció linearitása miatt a PCR ciklusszámát alacsonyra, 20 ciklusra vettük. Terjedelmi korlátok miatt a részletes optimalizációkat és azok eredményét nem írjuk le részleteiben, de mivel jelentős időt és anyagi ráfordítást jelentettek, felsorolásszerűen

jelezzük. Optimalizálást végeztünk az RT-hoz használt primer mix koncentrációján, a PCR-hez használt primermix és TAG-specifikus primer koncentrációján, a PCR reakció 3-féle hőmérsékletének – különösen az annealing lépésnek a hőmérsékletén és hosszán illetve a PCR reakció $MgCl_2$ koncentrációján és a PCR reakció ciklusszámán. Az egyes komponensek változtatását illetve ezek kombinációinak hatását QPCR módszerrel vizsgáltuk.

A végleges optimalizálás után, az amplifikálási reakció specificitását teszteltük először. Kísérleteink kimutatták, hogy már az RT lépésben a chlamydia génspecifikus primermix felülmúlta egy random hexamerrel végzett reakció specificitását. A primer mixxel végzett RT során 1.5-8 szor kevesebb humán mRNS-t (actin-b), humán rRNS-t (18S, 28S) és chlamydiális rRNS-t (16S) írtunk át cDNS-sé a chlamydiális mRNS-hez (momp) hasonlítva. Az amplifikáció második lépésében -a PCR amplifikáció során- a specificitás nagyságrendekkel tovább nőtt. A momp gén amplifikálási hatékonyságához képest a chlamydiális 16S rRNS átírása két nagyságrenddel, a humán rRNS és humán mRNS átírása 3-4 nagyságrenddel volt rosszabb! Ez azt jelenti, hogy az általunk kifejlesztett amplifikálási módszer a génspecifikus primermixeknek és a PCR reakció specificitásának köszönhetően nagyfokú specificitással bír, azok a gének, amelyeknek nincsenek benne a primerei a mixekben, gyakorlatilag marginális mértékben amplifikálódnak. A következő lépésben az amplifikálási reakció robusztusságát-reprodukálhatóságát és az amplifikáció hatékonyságát teszteltük egy 90 chlamydiális gént vizsgáló QPCR reakciókban. A kísérleti eredmények azt mutatták, hogy az amplifikálási reakció technikai reprodukálhatósága igen magas volt, a két technikai replikátum közötti korreláció a QPCR Ct értékekben 0.95, 0.97 és 0.99 volt ha 10ng, 20 ng illetve 40 ng totálRNS-ből indultunk ki. A reprodukálhatóság magasabb volt mint magáé a reverz transzkripcióé, különösen a 10 ng-os kiindulási mennyiségnél! Az amplifikációs efficencia 6427-11.143 fold között mozgott, ami eléri vagy meghaladja a gyári kitek amplifikációs rátáját. Azonban a gének között nagyfokú amplifikációs különbségeket kaptunk, ami viszont konzekvens volt a kiindulási RNS mennyiségétől függetlenül, és feltehetőleg az adott mRNS másodlagos szerkezetével állhat összefüggésben. A módszer tehát alkalmas arra, hogy két minta közötti kétszeres koncentrációkülönbséget is kimutasson. Amikor összehasonlítottuk a 40ng 20ng és 10ng mintákból származó gének expresszióját, akkor a 90 tesztelt gén medián hányadosa a 40ng/20 ng minták között 2.24 volt, a 20ng/10 ng minták között 1.47 volt. A módszer tehát alkalmas arra, hogy két minta közötti kétszeres koncentrációkülönbséget is kimutasson.

Az amplifikációs módszert *C. pneumoniae*-val fertőzött egértüdőből származó totálRNS-en alkalmaztuk. Az RNS-eket a fertőzés után 1 illetve 2 héttel izoláltuk. A tüdőkből QPCR-el mért chlamydiális DNS koncentráció két nagyságrenddel kevesebb volt a későbbi időpontban azt jelezve, hogy a baktériumok nagy része eliminálódott, illetve a elpusztulás előtti ún. perzisztens állapotba került. A két időpontot összehasonlítva tehát képet kaphatunk egy aktív és egy „látens” – perzisztens növekedés közötti *in vivo* génexpressziókülönbségről. A génexpressziót QPCR módszerrel vizsgáltuk minden egyes Chlamydiális génnél, tehát mintánként közel 1000 QPCR-t végeztünk. Időpontként 2 biológiai replikátummal dolgoztunk. A QPCR eredmények statisztikai analízise azt mutatta, hogy a két időpont között 216 gén expressziója esetén volt statisztikailag szignifikáns különbség. Az aktív növekedés során különösen erősen kifejeződő gének között általános metabolikus gének (*pgi*, *ispF*, *dapB*), chaperonok (*dnaJ*, *grpE*, *sycE*), riboszómális proteinek génjei (*rs7*, *rs8*, *rl32*), ABC transzporterek (*glnQ*, *abcX*) külső membrán proteinek (CPn0278) és hipotetikus gének voltak. Ezen gének kifejeződése jól korrelál az aktív növekedéshez kapcsolódó fokozott metabolizmussal. A perzisztens állapotban kifejeződő gének között sok hipotetikus gént találtunk illetve olyan géneket amelyek a transzkripció szabályozásáért

felelősek. Ilyen volt a már *in vitro* részletesen vizsgált *euo* gén, illetve az eddig nem vizsgált *yfgA* és *tctD* helix-turn-helix transzkripció faktorok illetve a DNS rekombináza *yggF*. Ezen transzkripció gének fokozott expressziója, illetve a transláció gének alacsonyabb expressziója egy olyan mechanizmust feltételez, hogy perzisztens állapotban *in vivo* a transzkripció és a transláció szétcsatolódik egymástól. Ehhez hasonló jelenséget *in vitro* megfigyeltek interferon-gammával előidézett perzisztenciában [2]. Összefoglalásul elmondható, hogy elsőként a világon nekünk sikerült teljes transzkriptom szinten megfigyelni a Chlamydiális génextpressziót *in vivo*. A kísérleteink során azonosított gének-géncsoportok potenciális gyógyszer és vakcinatargetek lehetnek. Kísérleteinket a *Molecular Microbiology* nevű folyóiratban szándékozunk publikálni.

A ChlamyTrans pályázat során feladat volt az is, hogy olyan géneket válasszunk ki, amelyek *in vivo* fertőzésben magas expressziót mutatnak és amelyekkel potenciálisan jól lehetne diagnosztizálni egy *in vivo* Chlamydia fertőzést QPCR módszerrel. Mivel az állatmodelles kísérletek során QPCR módszerrel mértük az összes gén expresszióját így egy olyan expressziós adatbázishoz jutottunk, amelyből egyszerűen kiválaszthatóak az akár humán diagnosztikára legalkalmasabbnak tűnő gének. A későbbiekben tervezzük, hogy 5-10 gén expresszióját releváns klinikai mintákban QPCR-el teszteljük, és összehasonlítjuk egy DNS alapú diagnosztika érzékenységével.

A Chlamydia fertőzés pathogenezisében részt vevő gazdasejti gének azonosítása

Irodalmi adatokból tudható, hogy Chlamydia fertőzés után lokálisan az NK sejtek, illetve a később beáramló CD4+ T sejtek interferon-gamma termelése nagyban szerepet játszik a Chlamydia fertőzés eliminálásában. Az eliminációs mechanizmus a chlamydiális LPS és az exogén interferon-gamma által indukált gazdasejti INDO gén illetve p47 GTPázok indukcióján alapszik. Azonban az eliminációban szerepet játszó gének indukciója mellett az egyéb gazdasejti gének expressziója teljes transzkriptom szinten eddig nem volt karakterizálva. Kísérleteink során DNS-chip módszerrel (Affymetrix Mouse 430A whole genome DNA chip) vizsgáltuk primer epitheliális sejtekben a *C. trachomatis* és az egérhez adaptálódott *C. muridarum* által indukált génextpresszióváltozást interferon-gamma hiányában és jelenlétében primer egér petevezetőből származó epithélsjtvonalon [3]. Eredményeink azt mutatták, hogy az interferon-gamma és a Chlamydia fertőzés együttesen jóval több gazdasejti gén expresszióját változtatta meg. Az interferon-gamma kezelés illetve a *C. trachomatis* infekció önmagában 82 illetve 185 gén expresszióját növelte, míg a kombinált kezelés 503 gén expresszióját fokozta. Hasonló mintázat szerint, az interferon-gamma kezelés illetve a *C. trachomatis* infekció önmagában 5 illetve 28 gén expresszióját csökkentette, míg a kombinált kezelés 513 gén expresszióját csökkentette. Hasonló effektus volt megfigyelhető az egértörzs *C. muridarum* esetében is. Figyelemre méltó az is, hogy a kombinált kezelés olyan gének expresszióját növelte, amelyek fontosak lehetnek a Chlamydia fertőzés által indukált gyulladáshoz vezető reakcióban. Ezen gének közé tartoznak például a gyulladáshoz vezető sejtek chemotaxisában szerepet játszó chemokinek MCP1, MCP3, GRO2, CXCL5, MCSF, GMCSF, IL6 és LIF, komplement rendszer komponensek C1, C3, C4, receptorok CD44, ICAM1, VCAM1, TLR2 és ZBP1. Az interferon-gamma és infekció együtthatása különösen megnövelte az antigén processzálasban szerepet játszó proteosómális gének - PSMB8, PSMB9, PSMB10, PSMD8, PSMD10, PSME1, PSME2- és prezentációban szerepet játszó gének -TAP1, TAP2 és különböző HLA allélek- expresszióját. E mellett a kombinált kezelés erőteljesen növelte egyes T-sejt chemokinek expresszióját, mint például a I-TAC, IP-10, MÍG és RANTES. Irodalmi adatokból tudható, hogy egyes cytokinek

hasonló szerkezettel rendelkeznek, mint az antibakteriális hatású chemokinek. Az IP-10, I-TAC és MIG cytokinek antibakteriális hatását más Gram- baktériumokon már leírták. Kísérleteink során a MIG cytokin antichlamydiás hatását is vizsgáltuk, mivel ez volt az egyik leginkább indukált gén a kombinált kezelés hatására. Először mi demonstráltuk az irodalomban, hogy a MIG-nek egy gyors, koncentrációfüggő antichlamydiás hatása van. 30 perc koinkubáció után több mint 90%-os redukción tapasztaltunk a humán *C.trachomatis* törzs infectivitásában. A *C.muridarum* esetében hasonló, de kevésbé dramatikus hatást tapasztaltunk, ami annak az eredménye is lehet, hogy az egér chlamydia törzs jobban adaptálódott az egér MIG hatásához.

Összefoglalva, adataink arra utalnak, hogy a gazdaszervezet fokozott interferon-gamma válasza mind a patológiás inflammáció elősegítésében, mind egy erősebb adaptív immunitás elősegítésében szerepet játszhat. A későbbiekben a destruktív *C.trachomatis* fertőzés által fokozottan érintett populáció kiszűrésében indokolt lehet az interferon-gamma illetve interferon-gamma receptor polimorfizmusok vizsgálata.

A potenciálisan direkt antibakteriális T-sejt chemokin mRNS-ek expresszióját *in vivo* is detektáltuk *C. pneumoniae*-vel fertőzött egértüdőben real-time PCR módszer segítségével [4]. A fertőzés után növekedett MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10 és I-TAC/CXCL11 génexpressziót mutattunk ki. Előzetes *in vitro* kísérleteink és irodalmi adatok alapján feltételeztük, hogy ezen chemokinek expresszióját az interferon-gamma is indukálhatja. Feltételezésünket alátámasztotta, hogy a fertőzött egerek tüdejében a MIG, IP-10 és az I-TAC génexpresszió az interferon-gamma gén expressziójával korrelált. Ahogyan előzetesen demonstráltuk *in vitro* [3], a MIG egy dózisdependens direkt antibakteriális hatással rendelkezett, amely a baktériummal való inkubáció után 15 perccel már jelentkezett. Far western-blot és LC-MS analízissel kimutattuk, hogy a MIG a Chlamydia egyik külső membrán fehérjéjével az omcB-vel illetve a Chlamydiális hősokkfehérjével (hsp60) képes interakcióba lépni. *In vivo* kísérleteink megerősítették az *in vitro* eredményeinket abban, hogy az epithelsejtek által szekretált T-sejt chemokinek nem csak az adaptív immunitás indukálásában játszanak szerepet, hanem lokálisan direkt antibakteriális hatásuk is lehet.

A *C. trachomatis* által okozott akut és krónikus gyulladás és a hozzá kapcsolódó fibrotikus folyamatok tehetőek felelőssé a petevezetők végleges elzáródásában ami kétoldali folyamat esetén irreverzibilis infertilitáshoz vezet. Állatmodellek alapján feltételezik, hogy a gyulladásos folyamat kifejlődésében döntő szerepük van a szövetet korán infiltráló neutrophil granulocytáknak. Annak ellenére, hogy ezen sejttípusnak ilyen jelentősége van a chlamydia fertőzések pathomechanizmusában, a neutrophil granulocyták *C.trachomatis* által indukált génexpressziós változásait nem vizsgálták teljes transzkriptom szinten. A ChlamyTrans pályázat keretében, ezen génexpressziós változásokat is feltérképeztük. A vizsgálatokhoz DMSO-val differenciáltatott humán HL-60 granulocytá sejt vonalat használtunk. Az előzőekben leírt egérikísérletekhez hasonlóan olyan kísérleteket is végeztünk amelyben a fertőzés mellett interferon-gammát is adtunk a sejtekhez, ezzel is részlegesen modellezve azt a cytokin környezetet ami lokálisan hat a granulocytákra. A génexpressziós változásokat ABI-SOLID újgenerációs transzkriptom szekvenálással vizsgáltuk 24 órával a fertőzés után. Kísérleteink azt mutatták, hogy a *C.trachomatis* fertőzés a granulocyták génexpresszióját erőteljesen modulálja. A fertőzés hatására közel 2000 gén expressziója nőtt vagy csökkent szignifikánsan, ami nagyságrendileg a humán gének 10%-át jelenti. A fertőzés hatására indukált gének között több olyan funkciós csoportú volt, amely szerepet játszhat a baktériumfertőzésre adott természetes immunválaszban és gyulladásban. Ezen indukált génexpressziójú funkciós csoportok között volt a TLR és JAK-STAT kaskád elemei

TLR2, TLR8, MYD88, TICAM, NFKB2, NFKBIA, NFKBIB, IKBKE, IKBKG, JUN, JAK3, STAT1, STAT2, STAT3 és SOCS1; neutrophil aktivációt jelző gének ICAM1, hét különböző integrin, a lizoszómális degradációban szerepet játszó katepszinek CTSA-D, CTSH, CTSS és CTSZ és egyéb katabolikus enzimek. Fontos kiemelni, hogy, a Chlamydia pathológiában szerepet játszó szöveti átépülésben részt vevő fibrózis indukáló cytokin PPBP illetve többféle mátrix metalloproteináz expressziója is fokozódott, például az MMP1, MMP9, MMP10 és MMP19. A *C. trachomatis* fertőzés különösen az interferon-gamma jelenlétében olyan intracelluláris védekező géneket is bekapcsolt, amelyek szerepet játszhatnak a baktérium intracelluláris elpusztításában. Ilyenek például a más sejttípusokban már leírtIDO, GBP1, GBP2, GBP4, GBP5, CXCL9 és az IDO-val megegyező funkciójú TDO2. Fontos eredménynek tartjuk, hogy a TDO2 szerepét eddig a Chlamydia fertőzések eliminálásában nem vizsgálták, ezt kísérleteink során először mi azonosítottuk. A *C. trachomatis* fertőzés – különösen interferon gamma jelenlétében olyan géneket is indukál, amelyek az adaptív immunitás indukálásában is szerepet játszhatnak, mint a T-sejt chemokín I-TAC, IP-10, MIG, RANTES illetve különösen az antigén processzálsban és az MHC-I alapú prezentációban szerepet játszó gének. A munkánkról készült kézirat gyakorlatilag elkészült, azt a közeljövőben a *The Journal of Infectious Diseases* című folyóiratba szándékozunk beküldeni.

Összegzésül elmondhatjuk, hogy ezen kísérletünk során több olyan géncsoportot azonosítottunk, amelyek a segíthetnek megmagyarázni azokat a mechanizmusokat amelyekkel a neutrophil granulocyták részt vehetnek a Chlamydia fertőzés szöveti pathológiájának kialakításában. Ezen gének polimorfizmusainak vizsgálata -az interferon-gammához hasonlóan- része lehet, egy a fokozottan veszélyeztetett betegcsoportot vizsgáló protokollnak.

Módszerfejlesztések Chlamydiális virulenciafaktorok azonosítására

ChlamyTrans pályázat célkitűzéseire kapcsolódóan olyan kutatásokban is részt vettünk, amelyek Chlamydiális kulcsgének, virulenciafaktorok azonosításában szerepet játszhatnak

A ChlamyTrans pályázat konzorcium egyik fő célkitűzése egy olyan génkönyvtár létrehozása volt, amely tartalmazza a két legfontosabb humán pathogén Chlamydia, a *C. pneumoniae* és a *C. trachomatis* összes génjét egy olyan „entry” vektorban, amelyből egyszerűen lehet tetszőleges specifikus plazmidba átvinni a génszekvenciát és bakteriális vagy akár eukaryota rendszerekben expresszálni a célfehérjét. Ezen célkitűzést sikerült teljesíteni: mindkét speciesből gyakorlatilag az összes gén PCR amplifikáció után egy Gateway entry vektorba lett beklónozva. A klónok szekvenciáit és in-frame pozícióját egyenként egy inzertspecifikus PCR termék szekvenálásával ellenőriztük. A proteomikai kísérletekhez a géneket az entry vektorból egy pDEST™15 vektorba vittük át és *Escherichia coli*-ban expresszáltattuk. A képződött fehérjék molekulatömegét egy kisebb mintaszámú random populációban gélelektroforézissel ellenőriztük. Protein-protein interakciós kísérletekhez a géneket Y2H pBD-Gate2 vektorba klónoztunk és élesztő kettős hibrid módszerrel vizsgáltuk a chlamydiális interakciós partnereket. A módszert ellenőrizendő a hármas típusú szekréción rendszer két tagjának, az flhA-nak és a fliF-nek az interakciós partnereit vizsgáltuk. A módszert validálva a fliF fehérjének a hármas típusú szekréción rendszer egyik fehérjéjét a fliN fehérjét azonosítottuk, mint interakciós partnert, míg az flhA fehérje interakciós partnereként a hármas típusú szekréción rendszer egyik chaperonfehérjéjét azonosítottuk. Fontos eredmény, hogy a klónozott fehérjék felhasználásával sikerült egy-egy olyan protein array-t is készíteni, amelyen közel az összes *C.*

trachomatis illetve a *C. pneumoniae* fehérje megtalálható. Ezen protein arrayek protein-protein interakciós vizsgálatokhoz illetve chlamydiaellenes immunválasz ellenanyagainak célefehérjéinek azonosítására is használhatók lesznek. Ezen munkáink eredményeiről a kéziratot elkészítettük, az benyújtás alatt van a *BMC Molecular Biology* című folyóirathoz. A ChlamyTrans projecten túlmutatóan, de a project keretében készített chlamydia protein arrayek felhasználásával jelenleg vizsgáljuk, hogy a különböző fokban neutralizáló *C. pneumoniae* ellenes ellenanyagok célfehérjében van-e különbség, van-e olyan chlamydiális fehérje, amely elleni ellenanyagválasz neutralizációhoz vezet. Ezen kísérletek eredményeképpen új vakcinatargeteket is akarunk azonosítani.

A Chlamydia fajok virulenciafaktorainak, feltérképezését lényegesen megnehezítette, hogy a nem volt olyan metódus, amellyel egyes Chlamydia géneket ki lehetett ütni, vagy funkciójukat csökkenteni lehetett. Ennek az egyik oka az volt, hogy a hagyományos transzfekciós technológiák nehezen működtek Chlamydia fertőzések esetén, mivel a baktérium genomját a gazdasejt plazmamembránja, az inklúzió membránja és a baktérium sejtmembránja veszi körül. Ezen probléma megkerülésére egy etil-metánszulfonát alapú kémiai mutagenizáló módszert vezettünk be, amellyel random módon pontmutációkat indukálhatunk a genomban [5]. A mutagén megfelelő alkalmazásával elérhető, hogy statisztikusan csak egy mutáció indukálódjon egy genomban. Ezen mutáns klónokat első körben CEL-I endonukleáz segítségével identifikáltuk, majd a target gén részletes szekvenálása után, ha az általunk kívánt stopmutáció volt jelen, akkor a baktériumot plakk purifikáltuk és fenotípusos analízisnek vetettük alá. A módszer használhatóságát a *Chlamydia trachomatis* tryptofán-szintáz génjének (*trpB*) kiütésével demonstráltuk. A *trpB* gén szerepet játszik az indol alapú tryptofánszintézisben, ami egy fontos elkerülő mechanizmus ha a gazdasejti tryptofánkoncentráció lecsökken. A mutáns klón képtelen volt az interferon-gamma által indukált gazdasejti tryptofán katabolizmusból adódó tryptofánkoncentráció csökkenést kivédeni. Módszerünk fontos előrelépés a Chlamydia pathogenezisben részt vevő gének azonosításában, az új gyógyszer és vakcinatargetek kijelölésében.

Köszönetemet fejezem ki magam és kollégáim, valamint a kooperációs partnereink nevében, hogy az OTKA támogatásával megvalósulhattak ezek kutatások.

Idézett cikkek

1. He S, Wurtzel O, Singh K, Froula JL, Yilmaz S, Tringe SG, Wang Z, Chen F, Lindquist EA, Sorek R *et al*: **Validation of two ribosomal RNA removal methods for microbial metatranscriptomics.** *Nat Methods* 2010, **7**(10):807-812.
2. Ouellette SP, Hatch TP, AbdelRahman YM, Rose LA, Belland RJ, Byrne GI: **Global transcriptional upregulation in the absence of increased translation in Chlamydia during IFN γ -mediated host cell tryptophan starvation.** *Mol Microbiol* 2006, **62**(5):1387-1401.
3. Burian K, Endresz V, Deak J, Kormanyos Z, Pal A, Nelson D, Virok DP: **Transcriptome analysis indicates an enhanced activation of adaptive and innate immunity by chlamydia-infected murine epithelial cells treated with interferon gamma.** *J Infect Dis* 2010, **202**(9):1405-1414.
4. Balogh EP, Faludi I, Virok DP, Endresz V, Burian K: **Chlamydia pneumoniae induces production of the defensin-like MIG/CXCL9, which has in vitro antichlamydial activity.** *Int J Med Microbiol* 2011, **301**(3):252-259.

5. Kari L, Goheen MM, Randall LB, Taylor LD, Carlson JH, Whitmire WM, Virok D, Rajaram K, Endresz V, McClarty G *et al*: **Generation of targeted *Chlamydia trachomatis* null mutants**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, **108**(17):7189-7193.