BUDAPESTI MŰSZAKI ÉS GAZDASÁGTUDOMÁNYI EGYETEM
VEGYÉSZMÉRNÖKI ÉS BIOMÉRNÖKI KAR
OLÁH GYÖRGY DOKTORI ISKOLA

Tézisfüzet

Új módszerek a malária paraziták kulcsfontosságú folyamatainak azonosítására és vizsgálatára

Molnár Petra Andrea

Témavezető: Dr. Vértessy G. Beáta

Konzulens: Dr. István Kézsmárki

Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

BME-TTK Maláriakutató Laboratórium

2020

Bevezetés

A malária napjaink egyik legjelentősebb megbetegedése, amely világszerte évi ~400.000 halálos áldozatot követel. A betegség kórokozói az eukarióták doménjébe tartozó paraziták, rendkívül komplex életciklusük egy vérszívó rovar és egy gerinces gazdaszervezet igénybevételével játszódik le. A gerinces gazdaszervezet véráramában végbemenő fejlődési szakasz kiemelt jelentőséggel bír, ennek neve intraeritrocita fázis. A folyamat a vörösvértestek inváziójával kezdődik, melyet egy változatos ideig tartó aszexuális fejlődési ciklus követ. A legjelentősebb humán parazita, a *Plasmodium falciparum* esetén ez a szakasz 48 óránként ismétlődik. A paraziták ennek során gyűrűből trophozoita, végezetül schizonta formákká fejlődnek, majd a vörösvértestet kirepesztve, a számos új utódparazita új vörösvértestet keres. A fejlődés során a vörösvértestekben lévő hemoglobin molekulák fontos tápanyagforrásként szolgálnak, azonban a hem molekulák emésztésére nem képesek a paraziták. Annak érdekében, hogy a szabad hem negatív hatásait elkerüljék, kristályokat képeznek belőlük, létrehozva így a hemozoint, vagy más néven malária pigmentet. A vérben lezajló fázis jelentősége abban áll, hogy a beteg ekkor észlel először tüneteket, így a diagnózis és a kezelés is ekkor lehetséges.

A paraziták genetikai állománya igen egyedi jellemvonásokat mutat, és a Plasmodium nemzetség tagjainak jelentős része azon organizmusok közé tartozik, melyek A:T bázispár tartalma rendkívül magas a G:C párokhoz képest, gyakran elérve 75-85%-ot. A paraziták genomja magas mutációs gyakorisággal is jellemezhető, mely kétségkívül kapcsolatban áll rendkívüli alkalmazkodóképességükkel. Jelenleg nincs forgalomban lévő vakcina a malária megelőzésére, így a védekezés és a kezelés is antimaláriás gyógyszerek révén valósul meg. Az első jelentős malériagyógyszert, a klorokint széleskörben alkalmazták a huszadik század második felében, azonban a paraziták körében gyorsan terjedő rezisztencia révén az ezredfordulóra hatástalanná vált. Az új reményt az artemizininek hozták meg, melyek a jelenlegi elsődleges kezelési módok alapját képezik. Sajnos a csökkenő hatás már most megmutatkozik bizonyos területeken.

A paraziták genom metabolizmusának, mutációinak és hibajavító mechanizmusainak jobb megértése elősegítheti a rezisztencia elleni harcot, és új, hatékonyabb antimaláriás szerek kifejlesztését. A véráramban lezajló ciklus során a paraziták igen nagy stressznek vannak kitéve, részben a hem metabolizmusból, részben pedig az immunrendszernek való ciklikus kitettségükből adódóan. Ezen túlmenően

nagyban támaszkodnak az itt elérhető tápanyagokra, és a gyógyszeres kezelés helyszíne szintén a véráram. A gyógyszerek jelenléte szelekciós nyomást fejt ki a parazitákra, amely genetikai mutációkhoz vezet. Azonban a többi, korábban említett stresszfaktor eleve hajlamosító tényezőként hat a genom integritására a gyógyszernyomás jelenléte nélkül is. Az extrém A:T arány növeli a DNS polimerázók hibalehetőségét, és igen nagy timidin-igényt is magával von. Az emlősökkel szemben a paraziták csak uridin prekurzorokból képesek timidin molekulákat szintetizálni. A polimerázok bizonyos körülmények között képesek az uridin molekulákat is beépíteni a DNS-be, és a paraziták magas timidin igénye eleve magasabb uridin szintet is jelent a kiegyensúlyozottabb A:T-G:C arányú organizmusokhoz képest. Meg kell jegyezni továbbá azt is, hogy a paraziták DNS szintézise magas oxidatív stressz mellett zajlik, amely a hemozoin metabolizmusuk eredménye. Az oxidatív stressz kedvez a citozin oxidatív dezaminációjának, melyet követően uracil molekulák maradnak a DNSben. Jelen dolgozatban leírt munkám egy része a *P. falciparum* paraziták genomi uracil tartalmának és az emögött meghúzódó folyamatok vizsgálatán alapul.

A malária elleni harc másik fontos eleme a rezisztencia folyamatos monitorozása és az új, potenciális gyógyszermolekulák tesztelése. Számos *in vitro* módszer létezik erre a célra, azonban ezek általában hosszú inkubációs időt, bonyolult mintaelőkészítést és mérést, valamint jelentős szakértelmet igényelnek. A gyógyszerhatékonyság gyors elemzésére jól ismert igény mutatkozik, mégis, számos módszer esetén 48-72 óra inkubációs idő szükséges a méréshez. A gyorsabb módszerek nemcsak a csökkentett munkaigény és gyorsabb eredmények terén hoznának jelentős változást, de különösen hasznosak lehetnek a gyors hatásmechanizmusú gyógyszerek vizsgálatára, melyek a paraziták korai fejlődési stádiumai ellen a leghatékonyabbak. Nagy előny lehet továbbá a személyes terápia lehetősége, amely egyrészt előnyös a pácienseknek, másrészt csökkentené az antimaláriás szerek túlzott használatát és ezáltal a rezisztencia kialakulásának sebességét. Az inkubációs időt gyakran a paraziták fejlődését jellemző markerek elérhetősége határozza meg. Számos módszer a DNS szintézisének vagy különféle proteinek termelődésének követésén alapul. A DNS szintézis azonban csak a vérárambeli ciklus második felében kezdődik, és a követni kívánt proteinek mennyisége is relatíve hosszú idő után éri el a módszerek kimutatási határát.

Kutatócsoportunk kifejlesztett egy új eszközt annak érdekében, hogy jobb alternatívát kínáljunk a jelenleg elérhető módszerekhez képest. A módszer a paraziták

által termelt kristályok egyedi mágneses és optikai tulajdonságait használja ki. Termelésük minden Plasmodium nemzetsége tartozó parazitára jellemző. A forgókristályos mláriadiagnosztikai eszköz (RMOD) elsősorban diagnosztikai célokkal született meg, és ezen képességét számos módon teszteltük [1,2]. Azonban én úgy véltem, hogy az RMOD igen ígéretes laboratóriumi eszközként is. Ebből adódóan a disszertációm jelentős része ennek vizsgálatáról szól. Mivel a hemozoin termelés a ciklus jelentős része során folyamatos, a paraziták fejlődése várhatóan egyetlen cikluson belül is detektálható *in vitro,* akár rövid inkubációs időt követően is.

Az *in vivo* technikáknak is igen fontos szerepe van a különféle immunológiai folyamatok, a patogenitás, a betegség lefolyásának vizsgálatában, és az oltóanyagok fejlesztésében. A rágcsáló modellek vizsgálatához is szükség van gyors, érzékeny, egyszerű és gazdaságos módszerekre, és úgy vélem, az RMOD ideális alternatíva lenne erre a célra is. Jellemzően négyféle, egereket fertőző Plasmodium parazitát használnak a kutatásban, melyek alapvető tulajdonságaikban megegyeznek a többi malériaparazitával, mégis eléggé változatosak ahhoz, hogy a humán patogén rokonaik ideális modelljei legyenek. Természetes gazdájukban a paraziták gyakran szinkronizált fejlődési sémát követnek, így egyszerre kezdik és fejezik be ciklusaikat. Ez a ciklusok végén jelentős hemozoin-felszabadulással jár. Laboratóriumi kultúrák esetén a felszabaduló kristályok a kultúrában felhalmozódnak. Élő szervezetkben azonban az immunrendszer hatásával is számolnunk kell. A hemozoint makrofágok és monociták gyűjtik össze, majd felhalmozódik a májban, lépben és csontvelőben. Ebből adódóan elképzelhető, hogy az élő szervezetben zajló hemozoin termelési és tisztulási folyamatok jelentős hatással vannak a magneto-optikai mérésekre. Mivel ezek a folyamatok határozzák meg a vérben mérhető hemozoin koncentrációt, a hemozoin-dinamika megértése rendkívül fontos. Tekintve az egeret fertőző paraziták változatosságát, ezen tulajdonságukban is nagy eltérések lehetnek annak függvényében, hogy az adott faj szinkronizáltan fejlődik-e, mennyire magas az átlagos parazitaszám a fertőzés során, és milyen multiplikációs rátával jellemezhetők. Fölmerül továbbá a kérdés, hogy a gyógyszeres kezelés hogyan befolyásolja a fertőzés és hemozoin dinamika jellemzőit, valamint hogy az RMOD képes-

---

[1] Butykai, A. *et al.* Malaria pigment crystals as magnetic micro-rotors: Key for high sensitivity diagnosis. *Sci. Rep.* **3**, 1431 (2013).

[2] Orban, A. *et al.* Evaluation of a novel magneto-optical method for the detection of malaria parasites. *PLoS One* **9**, 1–8 (2014).

e ezeket a változásokat kimutatni. Disszertációm utolsó fejezete a fönt említett kérdésekre kíván választ találni az RMOD módszer egérkísérletek során történő tesztelésével.

Összefoglalva, jelen dolgozatban a malária elleni küzdelem három fontos alapkutatási irányvonalát vizsgálom. Célom egyfelől, hogy lehetőleg egy ígéretes új eszközt mutassak be a malária gyorsabb, egyszerűbb *in vitro* és *in vivo* vizsgálatának segítésére, valamint közelebb kerüljek a legveszélyesebb humán malériaparazita, a *Plasmodium falciparum* genetikai állományát érintő, bizonyos mutációk mögött meghúzódó folyamatok megértéséhez.

Anyagok és módszerek

Humán és egér paraziták

Az *in vitro* kísérletekhez a *P. falciparum* 3D7 és W2 humán patogén törzseket az alábbi körülmények között tartottam fenn: a humán vörösvértestekből (5% hematokrit) és RPMI 1640-Albumax I alapú médiumból álló kultúrákat 37 °C-on, 5% O_2, 5% CO_2 és 90% N_2 atmoszférán tartottam. A kultúrákat mesterségesen szinkronizáltam szorbitol és Percoll módszerekkel. Az egérkísérletek során nem letális, szinkronizált *P. vinckei* lentum; letális, nem szinkronizált *Pyp230p(-)* GFP expresszáló *P. yoelii* 17X-NL és letális, nem szinkronizált *P. berghei* ANKA törzseket használtunk. Fertőzési módként fertőzött vörösvértestek vagy szúnyogból nyert sporozoita stádiumú paraziták farokvénán keresztüli injektálását és szúnyogcsípést alkalmaztunk. Minden állatkísérletet az adott intézmény etikai előírásainak megfelelően végeztünk.

A paraziták fejlődésének meghatározása

A parazitémia meghatározása a sztenderd módszerrel, azaz vékony kenetek optikai mikroszkópiás elemzésével vagy pedig áramlási citometriával történt. A hemozointartalmat és ezáltal a paraziták fejlődését az RMOD módszer segítségével határoztam meg.

Az uracil molekulák kimutatása

Két különböző kultúrából eltérő fejlődési stádiumú parazitákat gyűjtöttem, majd genomi DNS-t izoláltam QuickDNA Miniprep Plus kit segítségével (Zymo Research). Az uracil molekulák detektálását egy katalitikusan inaktív UNG konstrukt segítségével végeztem, majd egy, a csoportunk által kifejlesztett dot blot módszerrel vizualizáltam. A módszer leírását a Róna *et al.* (2016) publikáció tartalmazza, érzékenysége megegyezik a hasonló célú tömegspektrometirás módszerekével [3].

Gyógyszerek és gyógyszertesztek

A kísérletek során három jól ismert antimaláriás szert alkalmaztam 5 koncentrációban, ezek a klorokin, piperakin és dihidroartemizinin. A kísérleteket különféle parazitémia szinteken 10 vagy 48 órán keresztül végeztem. Az IC50 értékeket meghatároztuk és pLDH, HRP2 és radioizotópos hipoxantin próbák irodalomban elérhető eredményeivel hasonlítottam össze.

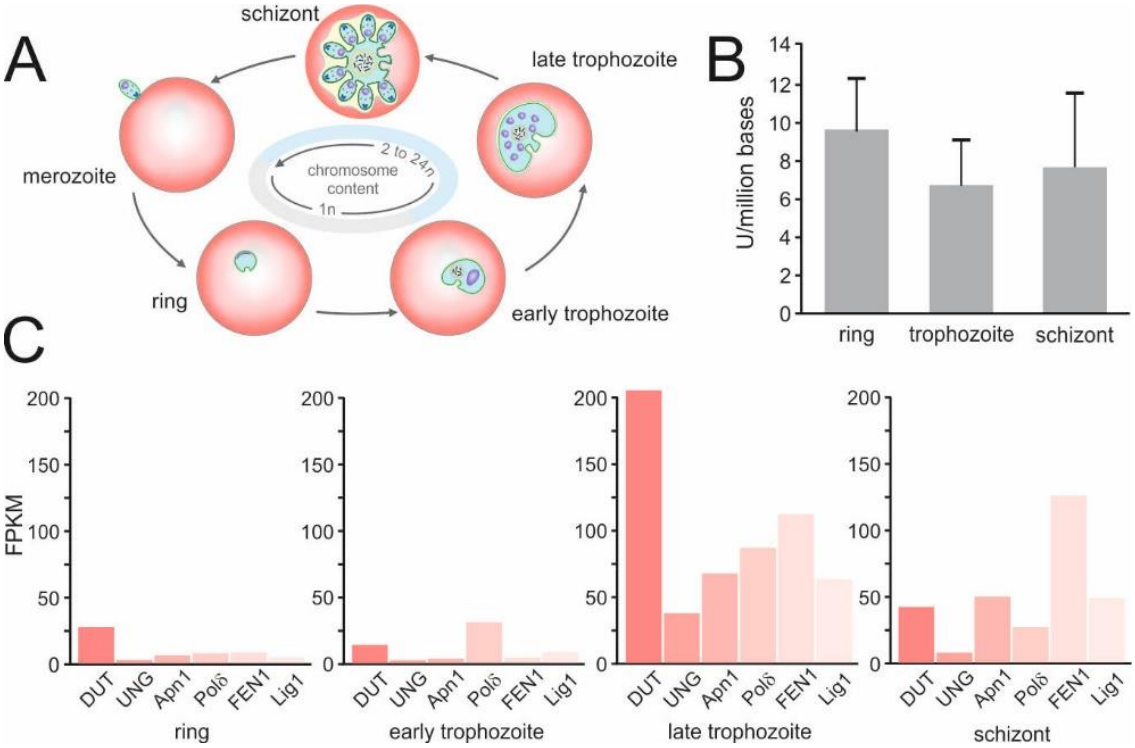
---

[3] Róna, G. *et al.* Detection of uracil within DNA using a sensitive labeling method for in vitro and cellular applications. *Nucleic Acids Res.* **44**, 1–13 (2016).

Eredmények

A *P. falciparum* genomi uracil tartalmának vizsgálata intraeritrocita ciklusa során

A genomi uracil szintjének meghatározásához parazitákat izoláltam gyűrű, trophozita és schizonta fejlődési stádiumokban. Az uracil tartalom uracil/millió bázis egységben lett meghatározva a kutatócsoportunk által fejlesztett dot blot módszer segítségével. Megállapítottam, hogy gyűrű paraziták esetében az átlagos uraciltartalom 9.6±2.8, trophozoiták esetén 6.7±2.4 és schizonták esetén 7.6±3.8 uracil/millió bázis. Ezek az értékek különféle vad típusú organizmusokkal és sejtvonalakkal összehasonlítva, melyek jellemzően 0.1-1, vagy még kevesebb uracil/millió bázis uraciltartalommal rendelkeznek, jelentősen magasabbak.



1. Ábra – A P. falciparum uracil metabolizmusa (A) Különféle fejlődési stádiumok kromoszómaszám-változása. **(B)** A *P. falciparum* fejlődési stádiumainak genomi uracil tartalma dot blot méréseim alapján. **(C)** A *P. falciparum* genomi uracil javításában feltételezhetően résztvevő enzimek expressziós szintjei a különböző fejlődési stádiumok során. Rövidítések: uracil-DNS-glikoziláz (UNG); AP-endonukleáz 1 (Apn1); DNS polimeráz δ (Polδ); Flap endonukleáz 1 (FEN1); DNS ligáz 1 (Lig1). FPKM: a génexpresszió normalizált becsült értéke RNS szekvenálási adatok alapján.

A korábban felsorolt, genomi uracilnak kedvező körülményeken túlmenően a DNS hibajavítási mechanizmusok hiányosságai is hozzájárulhatnak az emelkedett uracil szinthez. Összehasonlítottam az emlősökben és Plasmodiumban föllelhető uracil-javító mechanizmusokban, a rövid és a hosszú Báziskivágó Javításban (BER) résztvevő enzimeket. A parazitában számos, a rövid útvonalhoz kötődő enzim nem megtalálható, mely észrevételemet irodalmi források is alátámasztják. Ez figyelemre méltó, hiszen emlősök esetén a genomi uracil eltávolítása a rövid mechanizmus feladata. Megfigyeltem továbbá, hogy mindössze egy, a genomi uracil kivágásáért felelős uracil-DNS-glikoziláz van jelen a *P. falciparumban*. Ezzel szemben számos, különféle organizmus esetén négy különböző családba tartozó uracil-DNS-glikozilázokból álló készlet van jelen, melyek specifikus szerepkörökkel bírnak.

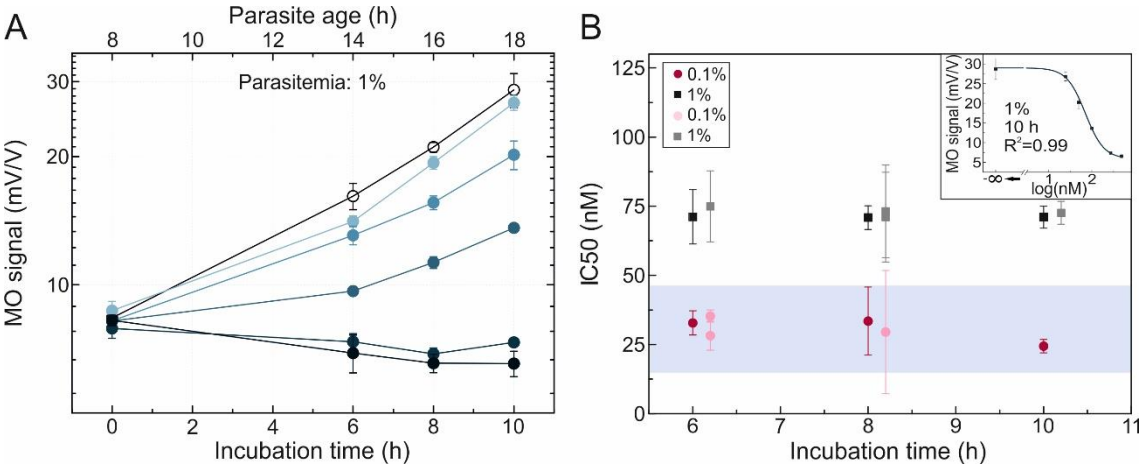
A parazitában föllelhető, hosszú javító mechanizmus enzimeinek expressziós szintjét vizsgálva megállapítottam, hogy életciklusfüggő expresszió jellemzi őket. Az eredmények arra engednek következtetni, hogy az uracil javítása a késői trophozoita fázis során kezdődik (1. Ábra). Ezt a feltevés alátámasztja, hogy a paraziták DNS szintézise, körülbelül 30 órával a vörösvértest invázióját követően szintén ebben a stádiumban kezdődik. A folyamat egészen a schizonta fázis közepéig tart, melyet az újonnan szintetizált DNS utódsejtekbe, azaz merozoitákba történő becsomagolódása zár le.

Az RMOD módszer alkalmazása *in vitro* gyógyszerhatékonyság-vizsgálatok során

A *P. falciparum* 3D7 törzs hemozoin termelését számos független kísérlet során elemeztük, mely alapján meghatároztuk az általános hemozoin termelési profilját. Megállapítottuk, hogy a kristályok szintézise kezdete már a korai gyűrű stádium során elkezdődik, ami nagyjából 6-10 óra parazita-életkornak felel meg.

Ez alapján számos kísérletet terveztem és végeztem el, melyek során három antimaláriás szert és két parazita törzset használtam. Minden gyógyszert teszteltem a *P. falciparum* 3D7 törzs segítségével, valamint a klorokin esetében a klorokin-rezisztens *P. falciparum* W2 törzset is használtam. A piperakin hatását rövid inkubációs idejű kísérletek során teszteltem, három parazitémia szinten. A klorokin hatását teljes intraeritrocita ciklusok, azaz 48 órás intervallumok során követtem nyomon, kettő parazitémia szinten. Az új antimaláriás szerek közül a dihidroartemizinint szintén 48 órán

keresztül alkalmaztam. Az IC50 értékeket minden mintavételi pontban meghatároztam, lefedve ezzel a paraziták fejlődésének széles spektrumát.

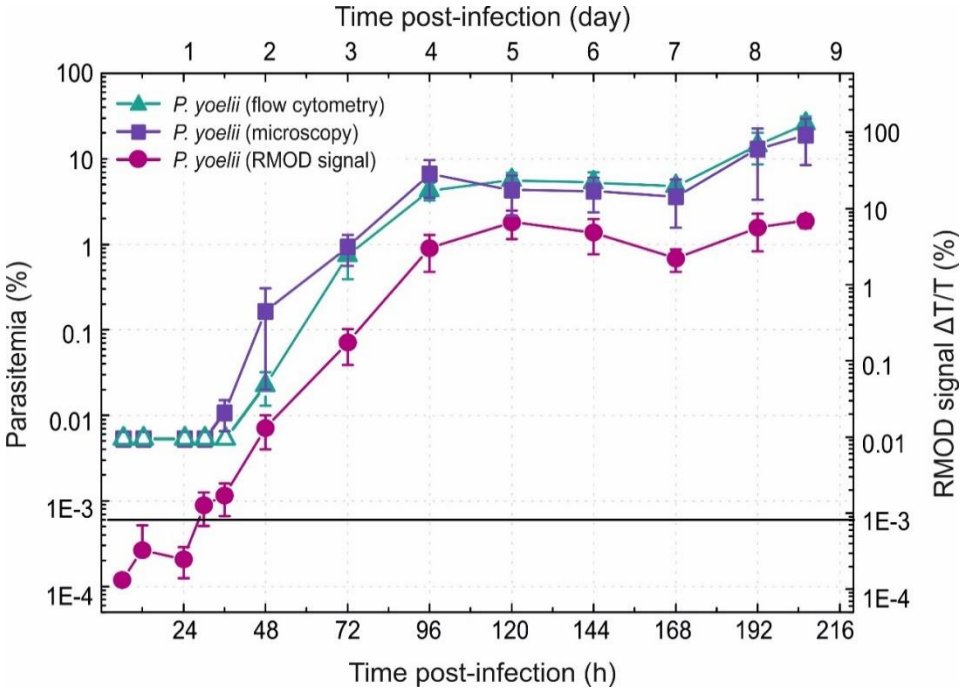


2. Ábra – A piperakin növekedésgátló hatása *P. falciparum* 3D7 kultúrákon. A Panel: Növekedési görbék, melyek az MO jelet ábrázolják az inkubációs idő függvényében, 1% parazitémia esetén. A fölső tengely a paraziták optikai mikroszkóppal meghatározott korát mutatja. A világosból sötétbe hajló színek a növekvő gyógyszerkoncentrációkat jelölik. Az üres fekete körök a gyógyszermentes kontroll mintákat jelölik. Minden pont három biológiai replikátum átlagát mutatja. **B Panel: 6, 8 és 10 óra inkubációs idő után meghatározott IC50 értékek 0.1 and 1% parazitémia esetén.** A piros és rózsaszín körök független, 0.1% parazitémián végzett kísérletek, míg a fekete és szürke körök 1% parazitémián végzett független kísérletek IC50 értékeit mutatják. A kék sáv az irodalomban elérhető IC50 értékek tartományát mutatja. Egy reprezentatív dózis-válasz görbe látható a jobb felső sarokban, amely az A panelen bemutatott kísérlet 10 órás időpontjához tartozik.

Az érzékeny törzzsel szemben minden gyógyszer hatásosnak bizonyult, a gyügyszerhatás már 6-10 óra inkubációs időt követően látható és IC50 értékek formájában számszerűsíthető volt (2. Ábra). Eredményeim az irodalomban föllelhető, jelentősen hosszabb inkubációs idő után nyert IC50 értékekkel összehangban állnak. A rövid inkubációs idő után számított értékek relevanciáját alátámasztja az a megfigyelés, hogy a teljes intraeritrocita ciklust lefedő IC50 értékek nem mutattak szignifikáns időfüggést. A számos tesztelt parazitémia közül a legalacsonyabb, azaz 0.01% parazitémia esetén is már 6 óra után látható volt a gyógyszermentes kontroll minta növekedése az RMOD módszer segítségével, de az IC50 értékek meghatározása nem volt lehetséges. A 0.1, 0.5 és 1% parazitémiával rendelkező minták során kiváló érzékenységet mutatott a módszerünk. Bebizonyosodott, hogy az RMOD cikluson belüli felbontással is képes követni a paraziták növekedését, így ideális eszköz a gyógyszerhatékonysági vizsgálatok elvégzésére.

Az RMOD módszer alkalmazása *in vivo* hemozoin termelési és ürülési folyamatok tanulmányozására egerekben

A hemozoin termelés és parazitémia értékek összehasonlítása során megállapítottuk, hogy közöttük jó korreláció áll fönn, azonban az adott parazitémia értékez tartozó MO jelek ~ 1 nagyságrendbeli tartományban mozoghatnak. Ez a jelenség jól magyarázható a paraziták biológiai sajátosságaival, miszerint a parazitémia egy intraeritrocita ciklus során konstans, de a hemozoin termelése folyamatos.



3. Ábra – A parazitémia és a hemozoin termelés összehasonlítása *P. yoelii* 17X-NL törzzsel fertőzött egerek esetén. A zöld háromszögek az áramlási citometriával, a lila négyzetek pedig az optikai mikroszkóppal megállapított parazitémia értékeket mutatják. A magenta körök az MO jelet szimbolizálják. Az üres szimbólumok minden esetben az adott módszerrel negatívnak mért mintákat mutatják. A fekete vonal az RMOD módszer kimutatási határát mutatja.

A hemozoin tartalom és a parazitémia összefüggésének megfigyelése érdekében *P. yoelii* 17X-NL (3. Ábra) és *P. vinckei* lentum nem letális törzsekkel fertőzött egereket vizsgáltunk különféle diagnosztikai módszerekkel számos cikluson keresztül. Az MO jel igen jól követte a parazitémiában látható változásokat, beleértve az intenzív növekedési és azt követő csökkenő tendenciát mutató szakaszokat. Ezen túlmenően a két törzsre jellemző multiplikációs ráta különbségek is láthatóak voltak a több napon át tartó kísérletek során. A *P. vinckei* és *P. yoelii* parazitákat fertőzött vörösvértestek injektálásával juttattuk be. A *P. yoelii* fertőzést már a második intraeritrocita ciklus során

kimutatta az RMOD, hasonlóan a mikroszkópos és áramlási citometriás eredményekhez. A *P. vinckei* fertőzést a mikroszkóp és az RMOD egyaránt a harmadik ciklusban mutatta ki. Egy független kísérlet során a letális *P. berghei* ANKA parazitákat szúnyogcsípéssel juttattuk az egerekbe, amivel a természetes fertőzési módot kívántuk modellezni. Ezekben az esetekben már az első vagy második ciklusban detektálható volt a fertőzés mikroszkóppal és az RMOD módszerrel is, míg mindkettő alkalmazott áramlási citometriás módszer későbbi detektálást tett csak lehetővé.

A gyógyszeres kezelés hatására csökkenést mutató parazitémia értékeket szintén jól követte az RMOD módszer a hemozoin termelés révén, sőt, a hemozoin tartalom csökkenése egy ciklussal előbb kimutatható volt, mint az parazitémia csökkenése. Az MO jelben bekövetkezett gyors változás arra mutat, hogy jelentős mennyiségű hemozoin szabadult föl és ürült ki a véráramból már a gyógyszer adagolását követő első ciklus során.

Az RMOD módszer sikeresen kimutatta a *P. vinckei* és *P. berghei* paraziták hemozoin termelését egy intraeritrocita cikluson belüli felbontással, fölfedve egy dinamikusan változó, csökkenő és növekvő jelprofilt, mely több, egymást követő ciklus során is jól megfigyelhető. A csökkenés oka az, hogy a ciklusok végén felszabaduló hemozoin kristályokat az immunrendszer azonnal elkezdi kiüríteni a véráramból, és az új ciklust kezdő paraziták korai fejlődési stádiumai még nem termelnek elegendő kristályt ahhoz, hogy a gyorsan ürülő szabad hemozoin mennyiségét felülmúlják.

Az itt összefoglalt eredmények alapján megállapítom, hogy az RMOD módszer ideális eszköz lehet az *in vivo* egér malária fertőzések megfigyelésére. A módszer lehetővé teszi a fertőzés gyors kimutatását, lefolyásának és kezelésének tanulmányozását függetlenül a paraziták letális vagy nem letális jellegétől, illetve szinkronizált vagy nem szinkronizált fejlődési sajátosságaitól.

Tézispontok

1. Megállapítottam, hogy a humán patogén *Plasmodium falciparum* mindhárom intraeritrocita fejlődési stádiumának genomja ~7-10 uracil/millió bázis mennyiségben tartalmazza a hagyományosan nem DNS alkotó bázist, az uracilt. Számos vad típusú organizmus átlagos genomi uracil tartalmához képest (0.1-1 uracil/millió bázis), a *P. falciparum* genomi uracil szintje szignifikánsan magasabb. **1-es Publikáció**
2. Megállapítottam, hogy az RMOD módszer egy ígéretes új technika antimaláriás gyógyszerek hatékonyságának tesztelésére *in vitro P.falciparum* kultúrák esetén. A módszer már 6-8 óra inkubációs időt követően lehetővé teszi releváns félhatásos-dózis (IC50) értékek meghatározását klorokin, piperakin és dihidroartemizinin kezelés esetén; akár 0.1% parazitémia esetén is. A legtöbb hasonló célú módszer 48-72 óra inkubációs időt, gyakran egyéb markerek és szakértelmet igénylő eszközök használatát igényli. Az RMOD jelentősen rövidebb kísérleti időt, markermentes és gyors detektálást tesz lehetővé egyszerű használat mellett is. **2-es Publikáció**
3. Megállapítottam, hogy az RMOD módszer a sztenderd mikroszkópos módszerhez és áramlási citometriához hasonló érzékenységgel alkalmas egerek malária fertőzésének kimutatására és vizsgálatára számos cikluson keresztül mind a nem letális, szinkronosan fejlődő *P. vinckei* lentum és a nem letális, nem szinkronosan fejlődő *P. yoelii* 17X-NL törzsek esetén. **3-as Publikáció**
4. Megállapítottam, hogy az RMOD módszer 24 órával a klorokin adminisztrációját követően képest volt kimutatni annak hatását *P. vinckei* lentum törzzsel fertőzött egerek esetén, továbbá egy teljes ciklussal korábban mutatta ki a gyógyszer hatását, mint a sztenderd mikroszkópos módszer. Az említett törzsre jellemző egy cikluson belüli hemozoin kinetikát olyan felbontással és precizitással határoztam meg, melyre tudtommal eddig nem volt példa. **3-as Publikáció**
5. Megállapítottam, hogy a vizsgált *in vivo* egér modellek esetén a paraziták hemozoin termelése és az immunrendszer hemozoin-eltávolító mechanizmusa dinamikus egyensúlyban van. A mért hemozoin mennyiség minden időpontban a jelenlévő paraziták által termelt hemozoin mennyiséget reflektálja, ennél fogva a hemozoin termelés az *in vivo* parazita-fejlődés ideális indikátorának tekinthető. **3-as és 4-es Publikáció**

Alkalmazási lehetőségek

A *P. falciparum* esetén megfigyelt, más organizmusokhoz képest szignifikánsan emelkedett genomi uracilszint hozzájárulhat a paraziták adaptációs mechanizmusaihoz. Érdekes lenne a genomi uracil szintet olyan gyógyszerek mellett vizsgálni, amelyek a természetes uracil-metabolizmushoz kapcsolódó folyamatokat célozzák, mint például a folát bioszintézis inhibitorok (Sulfadoxin, Pirimethamin). A nyomás hatására változó mutációs ráta vagy nagy gyakorisággal előforduló egypontos nukleotid-polimorfizmusok megjelenése olyan gének vagy folyamatok megismerését teheti lehetővé, amelyek révén fölfedhető a paraziták emelkedett uracil szintje és rendkívüli, antimaláriás szerekkel szembeni alkalmazkodóképessége közötti esetleges összefüggés.

Megállapítottam, hogy az RMOD módszer kiválóan alkalmazható antimaláriás gyógyszerek hatékonyságának *in vitro* tesztelésére, mivel szignifikánsan csökkenti a szükséges inkubációs időt és leegyszerűsíti a kísérleti procedúrát, melyek régóta fennálló célok az antimaláriás gyógyszerkutatásban. A módszert érdemes lenne tesztelni új antimaláriás szerek vizsgálata, *ex vivo* kísérletek és fejlődési stádium-specifikus gyógyszerhatás vizsgálatok során. Napjaink élvonalbeli gyógyszereivel, az artemizininekkel szembeni rezisztenica komoly fenyegetést jelent, és rezisztencia esetén a gyűrű stádiumú paraziták egyfajta alvó állapotával jár. Ennek során csak minimális metabolikus folyamatok zajlanak, nem termelődnek a különféle markerek, mint a DNS, fehérjék és hemozoin. Ebből adódóan a visszatérő paraziták kimutatása csak ~ 60-70 órával a gyógyszer elvételét követően mutathatók ki a rezisztencia-tesztek során. Tekintve, hogy a paraziták hemozoin termelése már igen fiatal korban kimutathatónak bizonyult az RMOD módszer segítségével, elképzelhetőnek tartom, hogy a visszatérő parazitákat előbb ki tudjuk mutatni, mint a más markereken alapuló módszerek.

Megállapítottam, hogy az RMOD módszer alkalmas *in vivo* egér malária fertőzések gyors kimutatására, a kezelési hatékonyság vizsgálatára és a fertőzés lefolyásának hosszútávú követésére függetlenül a paraziták letális vagy nem letális és szinkronos vagy nem szinkronos fejlődési jellegétől. Bebizonyosodott, hogy a hemozoin *in vivo* környezetben is ideális markere a paraziták növekedésének. A csoportunk által végrehajtott számos egérkísérlet terepi tesztjeink alapját képezte. Első, extenzív terepi tesztünkre Pápua Új-Guineában került sor, melynek eredményei jelenleg elbírálás alatt állnak egy nemzetközi folyóiratban.

Publikációk

A tézispontokhoz fölhasznált publikációim:

1. **Molnár, P.**, Marton, L., Izrael, R., Pálinkás, H. L. & Vértessy, B. G. Uracil moieties in *Plasmodium falciparum* genomic DNA. *FEBS Open Bio* **8**, 1763–1772 (2018). doi: 10.1002/2211-5463.12458. **IF: 2.23 I:6 FI:4.**

2. **Molnár, P.** *et al.* Rapid and quantitative antimalarial drug efficacy testing via the magneto-optical detection of hemozoin. *Sci. Rep.* **10**, 14025 (2020). doi: 10.1038/s41598-020-70860-y. **IF: 3.99**

3. Pukáncsik, M., **Molnár P.**, *et al.* Highly Sensitive and Rapid Characterization of the Development of Synchronized Blood Stage Malaria Parasites Via Magneto-Optical Hemozoin Quantification. *Biomolecules* **9**, 579 (2019). doi: 10.3390/biom9100579. **IF: 4.08 I:2**

4. Orban, A., Rebelo, M., **Molnar, P**., et al. Efficient monitoring of the blood-stage infection in a malaria rodent model by the rotating-crystal magneto-optical method. Sci. Rep. 6, 23218 (2016). doi: 10.1038/srep23218 **IF: 3.99 I:12 FI:9**

Elbírálás alatt álló publikációk:

1. Arndt, L., Koleala, T., Orbán, A., Ibam, C., Timinao, L., Lorry, L., Butykai, A., Karman, P., **Molnár, A. P**. et al. n.d. "Magneto-Optical Diagnosis of Symptomatic Malaria in Papua New Guinea." doi:10.1101/2020.05.14.20101543 **IF: 12.1**

Konferencia részvételeim:

2017- Deutsche Physikalische Gesellschaft Spring Meeting; Drezda, Németország: **szóbeli előadás**

2018 - Grandmaster Early Carreer Workshop, Bécs, Ausztria: **szóbeli előadás**

2018 - Oláh György Doktori Iskola PhD konferencia, Budapest, Magyarország: **szóbeli előadás**

2018 - BioMalPar - Biology and Pathology of the Malaria Parasite, Heidelberg, Németorszgá: **poszter prezentáció**

2018 - McDonnell Academy 7th International Workshop, Peking, Kína: **poszter prezentáció**

2019 - Grandmaster Early Carreer Workshop, Split, Horvátország: **szóbeli előadás**

2019 - Malaria in Melbourne, Melbourne, Victoria, Ausztrália: **szóbeli előadás**