

# **Különböző kémiai vegyületek és a sejt-autonóm immunitás hatásai a szexuálisan terjedő kórokozók szaporodására**

Ph.D. disszertáció

**Rafai Tímea**



**Dezső Virok M.D., Ph.D.**

Szegedi Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar

Orvos Mikrobiológiai és Immunbiológiai Intézet

Szeged 2019

## BEVEZETÉS

A szexuális úton terjedő betegségek (STD-k) tartós, globális problémát jelentenek. Világszerte több, mint egymillió ember fertőződik meg naponta, valamilyen szexuális úton terjedő kórokozóval. Az STD jellegű fertőzések közül a *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*) az egyik leggyakoribb. Az STD sok esetben tünetmentesek, vagy csak enyhe tüneteket produkálnak, mely nem elegendő a betegség felismeréséhez és kezeléséhez. A kezelés hiánya, pedig a nemi úton történő fertőzések kontrollálatlan terjedéséhez vezet. A lappangó és a látenciából reaktiválódó fertőzések szintén megnehezítik vagy ellehetetlenítik a terjedés megakadályozását. A *Chlamydia* és herpesz vírus fajokra jellemző intracelluláris életmód, melynek köszönhetően a fertőzés hónapoktól évekig, vagy akár életünk végéig lappanghat.

Jelen tanulmány különböző kémiai vegyületeknek a *Chlamydia* és HSV-2 szaporodására gyakorolt hatását vizsgálja, illetve célja, hogy azonosítsa azon egér géneket melyek részt vehetnek a *Chlamydia* különböző fajtáinak megsemmisítésében és az ellenük történő védekezésben.

### A *Chlamydia* nemzetség taxonómiája és mikrobiológiája

A *Chlamydiales* rendbe néhány faj tartozik, melyek közül a *C. trachomatis* és *C. pneumoniae* a legmeghatározóbbak. Szerológiai osztályzás alapján a *C. trachomatis* 2 biovariánusra csoportosítható, melyek tovább oszlanak néhány szerovariánusra. Felnőtteknél a D-K szerovariánsokhoz kapcsolódó urogenitális fertőzések olyan kórképek kialakulásához vezetnek, mint a húgycsőgyulladás, méhnyakgyulladás és kismedencei gyulladás. Továbbá a perinatális fertőzések, újszülötteknél okozhatnak kötőhártyagyulladást, torokgyulladást és tüdőgyulladást. Az LGV biovariánsok által történő fertőzések gyakorisága lényegesen alacsonyabb, főleg Afrika egyes területein, Délkelet-Ázsiában, Indiában, a Karib-szigeteken és Dél-Amerikában endemikusak. Ugyanakkor, az LGV fertőzések gyakorisága az elmúlt 10 évben Észak-Amerikában és Európában jelentősen megnövekedett a homoszexuális férfiak körében.

A *Chlamydiae* baktériumok kizárólagosan intracelluláris élősködők, melyek főképp a légzőrendszer és urogenitális rendszer hámsejtjeit képesek fertőzni. Két morfológiai formában léteznek: a fertőzőképes elemi test (EB), valamint a nem fertőző, de metabolikusan aktív retikuláris test (RB). Az EB képes hozzátapadni a nyálkahártya hámszövetének sejtfelszínén található heparin szulfát proteoglikánhoz, majd bejutni a sejt belsejébe. Behatolás után az EB-k különálló membránnal határolt vezikulákba, úgy nevezett zárványokba kerülnek, melyek a sejt perinukleáris részére transzportálódnak. Elsődleges differenciálódás közben a membrán határolt és a lízistől védett EB-k, RB-ké differenciálódnak. A differenciálódás után az RB-k bináris hasadás révén osztódnak a zárványban. 24-72 óra után megtörténik a második differenciálódás, mely során az RB-k visszadifferenciálódnak EB-ké. A ciklus végén a fertőzőképes EB-k exocitózis vagy extrúzió révén kiszabadulnak, készen állva további sejtek megfertőzésére.

### A *Chlamydia trachomatis* fertőzés kórélettana és a gazdaszervezet reakciója

A *Chlamydia* fertőzések fő célpontjai a hámsejtek, melyek nem hivatásos immunsejtek, viszont rendelkeznek autonóm immunitással. A természetes immunválasz sejtjei és a hámsejtek toll-like receptorokkal (TLR-ek) rendelkeznek, melyek felismerik a *Chlamydia* patogén-asszociált molekuláris mintázatait (PAMP-ok). A *Chlamydiae* számos olyan komponenssel rendelkezik, melyek PAMP-ként szolgálhatnak. A TLR2 és TLR4 receptorok ismerik fel a *Chlamydia* faj lipopoliszacharid (LPS) és hősokk fehérjéit (HSP-k). A fertőzött hámsejtek TLR-jei és a *Chlamydia* PAMP-ok között történő kapcsolódás idézi elő a gyulladást serkentő metabolitok termelését. A gyulladást serkentő metabolitok, monocitákat és dendritikus sejteket (DC-eket) toboroznak a gyulladás helyére, majd ezek a monociták fagocitikus sejtekké, aktivált makrofágokká differenciálódnak. A patogén fagocitózisa után az aktív makrofágok még több citokint termelnek. Ezek a citokinek egyben kemokinek, melyek további immunsejteket, neutrofil- és természetes ölüsejteket (NK) vonzanak és aktiválnak. Az NK és neutrofil sejtek citotoxikusak, csökkentik a közvetlen chlamydiás fertőzést és gátolják a terjedését. A fertőzött hámsejtek, DC-k, makrofágok és neutrofilok antigént prezentálnak a fő

hisztokompatibilitási komplex (MHC) receptoraikon. Ezek az antigén prezentáló sejtek az antigén bemutatásával aktiválják a T limfocitákat, mely által megkezdődik a sejt által közvetített és a humorális immunválaszt. A T limfociták két fő csoportját alkotják a CD4+ T helper sejtek és CD8+ T citotoxikus sejtek. A hámsejtek MHCI receptoraik révén prezentálják az antigént mely által aktiválják a CD8+ sejteket, míg a hivatásos antigén prezentáló immunsejtek az MHCII receptorokon jelenítik meg az antigéneket és CD4+ sejteket aktiválják. A CD8+ T sejtek a fertőzött sejtek halálát idézik elő. A CD4+ sejtek citokin termelési profiljuk alapján tovább csoportosíthatók Th1 és Th2 sejtekre. A Th1 válasz az intracelluláris kórokozók ellen irányul. A Th1 sejtek interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) citokint termelnek mely előidézi a sejt által közvetített adaptív immunitást és a fagocita-dependens gyulladást a chlamydiás fertőzésekben. Az adaptív immunitás másik része a B limfocita válasz. A B limfociták szabályozzák a humorális immunválaszt, majd a plazmasejté váló differenciációt követően antitesteket állítanak elő és immunológiai memóriát hoznak létre a patogén ellen. A nyálkahártyában lokálisan specifikus antitestek termelődnek mind az elsődleges és a másodlagos fertőzések alkalmával. Ezen antitestek jellemzően monoklonális immunglobulin A (IgA) és immunglobulin G (IgG) összetételűek. Ezen antitestek a *Chlamydia* MOMP és HSP fehérjében specifikus epitópokat ismernek fel. A MOMP specifikus antitestek a *Chlamydia* extracelluláris formáit ismerik fel és neutralizálják, ugyanakkor az újra-fertőzések alkalmával erősítik a celluláris immunválaszt. HSP specifikus antitestek súlyosabb fertőzések esetében jellemzők, a szérumban emelkedett szintet mutatnak. A természetes immunitás a legfontosabb, mivel ez az első védelmi vonal a *Chlamydia* fertőzések alkalmával, míg az adaptív immunválasz a kórokozó végleges eliminálásában vesz részt, ugyanakkor az immunológiai memória létrehozásával védelmet nyújt a későbbi fertőzések ellen. Szöveti szinten az adaptív és természetes immunitás közt szoros a kapcsolat, az elemek közötti kommunikációt és koordinációt citokinek határozzák meg. A fertőzött hámsejtek által elsőként termelődő citokinek, mint például az interleukin-1-alfa és interleukin-1-béta (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ), valamint a tumor nekrozis faktor-alfa (TNF $\alpha$ ), IL-8 és IL-6 az úgynevezett pro-inflammatorikus citokinek. Az IL-8 kemo-attraktánsként viselkedik és megnöveli az ICAM-1 és VCAM-1 adhéziós molekulák kifejeződését, illetve serkenti az immunsejtek toborzását a fertőzés helyére. Sok egyéb citokin, mint az IL-10, IL-12, IL-15 szintén jelen vannak, különböző szerepekben a fertőzések során. Az immunválasz összetett útvonalaiban, ezen szerepek különbözőek lehetnek, helyenként aktiváló vagy gátló hatással bírhatnak. Az IFN- $\gamma$  egy kulcs fontosságú citokin a chlamydiás fertőzésekben, az NK és Th1 sejtek termelik. Számos különböző hatása mellett az IFN- $\gamma$  indukálja a gazda sejt indolamin 2,3-dioxigenáz (IDO) enzim termelését a fertőzött sejtekben, ez által befolyásolva a triptofán hozzáférhetőségét a sejtben belül. A triptofán bomlása a kinurenin degradációs útvonal folyamán történik, ahol is az IDO katalizálja az útvonal első lépését, melyben az L-triptofán N-formilkinunerin oxidálódik. Mivel a *Chlamydia* triptofán auxotróf, a triptofán hozzáférés gátlása a patogén számára, hatékony védekezési stratégiának bizonyul. Az IFN- $\gamma$  más védekező gének kifejeződését is növeli, mint amilyen az indukálható nitrogén-monoxid-szintáz (iNOS) enzim, mely reaktív nitrogén intermedierek termelését katalizálja, mint amilyen a nitrogén-monoxid (NO). E mellett csökkenti a transferrin receptorokat a fertőzött sejtek felületén, mely intracelluláris vashiányhoz vezet, így korlátozva a kórokozók szaporodását. Az IFN- $\gamma$  és egyéb lokálisan termelt citokinek komplex hatással bírnak mind a szövetre, a fehérjék és gének expressziójára és a metabolizmusra. Különböző vegyületek termelődését válthatják ki, mint például a reaktív oxigén fajták, a mátrix metalloproteázok, elasztázok, kollagenázok, kathepszinek, valamint lizozimekét is. Ezen fehérjék termelődése mind az akut és krónikus gyulladás alkalmával szövet-átrendeződéshez és a fibroblasztok burjánzásához vezethetnek. Az agresszív immunválasz ellenére a legtöbb *C. trachomatis* által okozott fertőzés viszont tünetmentes, így kezelésre sem kerül sor. A férfi populációban az esetek 75%-a tünetmentes marad, a női populációban viszont akár 76.7%-a is tünetmentes lehet.

### **A vaginális gélek hatása a *Chlamydia* fertőzésekre**

A *Chlamydia* fertőzések kockázatát nagy mértékben növelik a méhnyak és a vaginális mikrokörnyezet elemei, beleértve a vaginális laktobacillusokat és az indol pozitív baktériumokat. A vaginális gélek síkosítóként, vagy terápiás gélek formájában kerülhetnek ebbe a mikrokörnyezetbe. Ezen vaginális gélek jelen vannak a szexuális közösetés folyamán ezáltal nagy jelentőséggel lehetnek a *Chlamydia* és más STD jellegű fertőzések terjedésére. A vaginális gélek fő alkotó eleme a gélképző ágens. A hidroxietil-cellulóz (HEC) az egyik leggyakrabban alkalmazott gélképző anyag, mely síkosítóban és terápiás gélekben egyaránt megtalálható.

Annak ellenére, hogy milyen potenciális jelentősége lehet a fertőzés terjedésére a gélképző ágenseknek, alig van róla tudományos adat.

### **A *Chlamydia* fertőzések *in vivo* modelljei**

A fertőzések védőoltással történő megelőzése jó megoldás lenne, azonban hatékony védőoltást még nem sikerült kifejleszteni. A védőoltások fejlesztésében főként egérmodelleket használnak, viszont az emberek és egerek immunrendszerei közti különbségek, mint az úgynevezett sejt-autonóm immunitás, megnehezítik a két rendszer összehasonlítását. A sejt-autonóm immunitás a gazdasejtek alapvető tulajdonsága, mely elindítja az intracelluláris kórokozók szaporodását gátló védelmi mechanizmusokat. Ezek a védelmi gének többnyire indukálhatók, a IFN- $\gamma$  pedig egy jelentős indukáló citokin. Korábban leírtuk, hogy a fő intracelluláris anti-chlamydiás védelmi mechanizmus humán sejteknél az IFN- $\gamma$  által előidézettIDO kifejeződés, mely az intracelluláris triptofán készlet degradációjához vezet, majd a triptofán-auxotróf *C. trachomatis* halálához. E védekező mechanizmus *in vitro* hatékony mind a humán *C. trachomatis* és a genetikailag igen hasonló egér *Chlamydia* fajra, a *C. muridarum*-ra. Ugyanakkor az *in vitro* adatok azt mutatták ki, hogy az IDO-t nem a *Chlamydia* fertőzés és/vagy IFN- $\gamma$  idézi elő egér hámsejtekben. Ezzel szemben az IFN- $\gamma$  által kezelt és *Chlamydia* által fertőzött egér hámsejtek microarray-es vizsgálata arra utal, hogy az IFN-indukálható GTPázok a vélt gazdagének, melyek interferálnak a humán *Chlamydia* fajták fejlődési ciklusával. Az egér *Chlamydia* fajták vélhetően olyan mechanizmusokat fejlesztettek ki melyek hatástalanítják a GTPáz választ. Ennek ellenére a *C. muridarum* kórokozó gyorsan eliminálódik az egér méhnyak-vaginális rendszeréből, tehát az egerekben mindmáig ismeretlen megsemmisítő mechanizmusok léteznek, melyek *in vivo* hatékonyak az egér specifikus *Chlamydia* ellen.

### **A herpesz szimplex vírusok**

A herpesz szimplex vírus a *Herpesviridae* család tagja és két faj a HSV-1, mely a herpesz labiális kórokozója, illetve HSV-2, a herpesz genitális kórokozója tartozik közéjük. A HSV-1 és HSV-2 egyaránt okozhat herpesz genitális, de az esetek többségében a HSV-2 okozza. A HSV-1 által okozott herpesz genitális gyakorisága növekedésben van, főképp a fiatalok körében, melynek oka az orális szex gyakorlata.

### **A herpesz szimplex vírusok mikrobiológiája és patológiája**

A HSV virionok viszonylag nagy vírus részecskék, melyek ikozahedrális protein kapszidba ágyazott kettős szálú lineáris DNS-ből állnak. A HSV-2 által történő fertőzések közvetlen kapcsolat révén valósulnak meg és többnyire tünetmentesek. A virion a hámsejteket és a neuronokat képes fertőzni. A fertőzést követően a vírus lappang, majd az érző idegeken keresztül újra aktiválódhat és visszatérhet a fertőzés elsődlegese létrejöttének helyére. A fertőzés újra aktiválódását okozhatja számos fiziológiai és környezeti faktor, mint például láz, érzelmi hatások, hormonális változások, trauma, stressz, kimerültség, immun-szuppresszió, vagy más fertőzés. A tüneteket produkáló és tünet mentes személyek egyaránt képesek tovább fertőzni a szexuális partnereiket. Terhes nőknél mind az elsődleges és a rekurrens HSV fertőzések képesek a méhen belül a magzat fertőzésre.

### **Herpesz szimplex vírus által okozott fertőzések terápiaja**

A HSV-k virális timidin kinázokat kódolnak, melyek felhasználhatóak a szelektív toxicitás növelésre, mely kizárólag a fertőzött sejteket érinti. Az acyclovir (ACV), valacyclovir, penciclovir (PCV), famciclovir szelektív mechanizmusa abban rejlik, hogy sokkal nagyobb valószínűséggel foszforilálódnak a vírus TK-ja által, mint a gazdasejti TK által. Az első foszforilációt követően a további foszforilációk már a gazdasejt kináza által történik meg, mely által létre jön a trifoszfát forma, mely beépül az újonnan szintetizált DNS szálba. A beépült nukleozid analógok szerkezet változást idéznek elő a DNS-ben ez által megakadályozva a

DNS szintézist. Jelenleg ezen nukleozid analógok a sztenderd, elsődleges gyógyszerek a HSV fertőzések ellen.

### **Gyógyszerrezisztens herpesz szimplex vírusok**

A HSV fertőzések kezelésére, mint feljebb leírtuk, van pár sztenderd elsődlegesen alkalmazható nukleozid analóg, viszont a fertőzések jelentős problémát jelentenek a gyógyszerrezisztens HSV esetében, különösen az immunkompromittált populációban. A HSV rezisztencia négy mechanizmus révén jöhet létre. (1) Hiányzik vagy csökkent a TK aktivitása a rezisztens fajnak, vagy (2) alacsony mennyiségű a TK termelése. Szintén lehetséges, hogy (3) a vírusos TK proteinek megváltozott a szubsztrát specificitása, valamint az utolsó, legkevésbé valószínű eset, amikor (4) a DNS polimeráz génnek változik meg a szubsztrát specificitása. Globálisan az ACV-rezisztens HSV fertőzések előfordulása 2.5% és 10% között van immunkompromittált betegek esetében. Az ACV-rezisztens fajok szinte mindig rezisztensek más TK-dependens gyógyszerekre is, mint a PCV és famciclovir.

### **Újszerű antivirális szerek a herpesz szimplex vírusok ellen**

Hátrányai ellenére az ACV még mindig az első számú választás a kezeléskor. Ennek ellenére, sürgősen szükség van új antivirális szerek felfedezésére és fejlesztésére, melyek képesek enyhíteni a vírusos fertőzéseket mellékhatások nélkül. Ezt illetően a gyógynövények és természetes hatóanyagaik biztonságos alapot jelentenek. Különböző aromatikusan győgnövények esszenciális olajai igen aktívak egyes vírusos megbetegedések ellen, például a balzsamolaj, teafaolaj, valamint a borsmentaolaj jelentős antiherpetikus hatással bírnak *in vitro*. Ezek az esszenciális olajok szintén erősen aktívak az ACV-rezisztens HSV fajták ellen. Érdemes észben tartani, hogy ezek az antivirális gyógyszerek nem gyógyítják meg a fertőzéseket. Az antivirális kezelés csupán csökkenti a kitérés súlyosságát és hosszát, gyorsítja a sebek gyógyulását, meggátolja az új sebek kialakulását, illetve csökkenti a fájdalmat és a viszketést. A vírus látenciát alakít ki a testen még a kitérés között is. Amíg a vírusos fertőzések teljes megsemmisítése nem lehetséges, a HSV elleni új szerek kifejlesztése fontos marad.

### **JELÉN KUTATÁS CÉLJAI**

- 1. cél:** A vaginális gélek fő alkotó elemének, a hidroxietil-cellulóz (HEC) gélképző ágensnek a *Chlamydia trachomatis* növekedésére gyakorolt hatását *in vitro* és *in vivo* felmérni.
- 2. cél:** Azon egér védelmi gének megtalálása, melyek szerepet játszanak az egér *Chlamydia* fajták megsemmisítésében, illetve azon gének azonosítása, melyek hatékonyak lehetnek az humán *Chlamydia* fajták ellen.
- 3. cél:** Azonosítani egy potenciálisan újszerű antivirális vegyületet, mely a homoktövis, *Elaeagnus rhamnoides* (*E. rhamnoides*) termésének kivonata.

## ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### Sejtvonalak

Jelen tanulmányban az alábbiakat használtuk: HeLa 229 (ATCC), McCoy (ECACC) és Vero sejteket (ATCC)

### Chlamydia fajták

*C. trachomatis* (D szerovariáns, UW3/CX referencia fajta, és E szerovariáns DK20 fajta; ATCC) és *C. muridarum* Nigg fajokat McCoy sejtekben szaporítottuk. *C. pneumoniae*, HEp-2 sejtekben szaporítottuk.

### *Elaeagnus rhamnoides*-ből és *Rumex aquaticus*-ből kivont vegyületek

A kivont vegyületeket partnerünk, Hohmann Judit jóvoltából kaptuk. Az 1. vegyület (6,9-dihidroxi-1-oxo-14-noreudesm-5,7,9-trién), 2. vegyület (2-hidroxi-7-izopropil-1-metoxi-4-metil-1,4-naftokinon), 3. vegyület (metoxi-szubsztituált fenilpropán dimer) és 4. vegyület (caulexin C) az *E. rhamnoides* kivonatai. Az 5. vegyület (musizin), 6. vegyület (musizin-8-O-glükozid), 7. vegyület (torachryson-8-O-glükozid) és 8. vegyület (2-methoxystipandron) szubsztituált naftalének, az *R. aquaticus* kivonatai.

### Hidroxietil-cellulóz oldat készítése vaginális szimuláns pufferben

A HEC vizes oldata az alábbi módon készült: 30 mg HEC polimer feloldása 1 ml fiziológiás sóoldatban (0.9% w/v NaCl) melyet felező-hígítások követtek a vaginális szimulánsban. Az alkalmazott HEC koncentrációja 1.5 – 0.023% w/v között volt. 1 L vaginális szimuláns puffer vegyülete az alábbiakat tartalmazta: NaCl 3.51 g/l; KOH 1.40 g/l; Ca(OH)<sub>2</sub> 0.222 g/l; szarvasmarha szérum albumin 0.018 g/l; tejsav 2.00 g/l; ecetsav 1.00 g/l; glicerol 0.16 g/l; karbamid 0.4 g/l; glükóz 5.0 g/l melyet vízben oldottunk. A vaginális szimuláns pH értékét 4.2-re vagy 7.0-ra kalibráltuk NaOH és HCl oldatokkal.

### A Hidroxietil-cellulóz hatásának vizsgálata *Chlamydia trachomatis* D és E szerovariánsok HeLa sejtekben történő tenyésztésekor

HeLa 299 sejtek tenyésztése 96-mélyedéssel lemezekon történt,  $4 \times 10^4$  sejt/mélyedés sűrűséggel 100  $\mu$ l minimális esszenciális médiumba (MEM) Earle sóoldattal, 10% hőaktivált magzati szarvasmarha szérummal. A következő nap 90%-os konfluenciával rendelkező sejteket fertőztük miután kétszer megmostuk 100  $\mu$ l pH 7.4 foszfát puffer sóoldattal (PBS). A fertőzés előtt az inokulumot pre-inkubáltuk HEC felezőhígítási sorozatban (1.5-0.023 % w/v koncentráció) *C. trachomatis* D és E szerovariánsokkal 4.2 és 7.0 pH értéken. A kontrollcsoport esetében az inokulumot a vaginális szimuláns pufferben 4.2 és 7.0 pH értéken pre-inkubáltuk 1 óráig 37°C, 5% CO<sub>2</sub> mellett. A pre-inkubációt követően, minden csoportot felfuszpendáltunk 0.5% (w/v) glükóz médiumban és hozzáadtuk a sejtekhez. A fertőzést 60 perc inkubációval értük el 37°C, 5% CO<sub>2</sub> mellett, centrifugálás nélkül. A fertőzés után a sejteket kétszer mostuk PBS-sel, majd egy 0.1  $\mu$ g/ml cycloheximide tartalmú médiumot adtunk a sejtekhez. A 48 órás inkubáció után a médiumot eltávolítottuk a sejtekről, kétszer átmostuk PBS-sel és 100  $\mu$ l Milli-Q (MQ) vizet adtunk a sejtekhez. A sejt lízist két fagyasztás-olvasztás ciklus által értük el, egy gyors fagyasztással (-80°C, 45 perc), majd gyors olvasztással sejtráztáron. A sejtlízátumot alaposan felkevertük a lemez-mélyedések pereménél is, többszörös pipettával. Ezután a lízátumot szolgált mintául a qPCR elemzésnél.

## **A *Chlamydia trachomatis* D és E szerovariánsok szaporodásának vizsgálata direkt kvantitatív PCR segítségével (qPCR)**

A qPCR vizsgálatot a Bio-Rad CFX96 real time rendszer segítségével végeztük. A SsoFast EvaGreen qPCR Supermix master mix és *C. trachomatis pykF* génspecifikus primer párt használtuk. A primer sorozatok az alábbiak: *pykF-F*: 5'-GTTGCCAACGCCATTTACGATGGA-3', és *pykF-R*: 5'-TGCATGTACAGGATGGGCTCCTAA-3'. 5 µl SsoFast EvaGreen supermix, 1–1 µl forward és reverse primerekkel (mindegyik 10 pmol), 1 µl templátot és 2 µl MQ vízből állt össze a PCR mixtúra melynek végtérfogata 10 µl volt. 40 PCR ciklust mértünk, melyek 20 másodpercig 95 °C-on, 1 percig 64 °C-on, futott, illetve 10 perc 95 °C-os polimeráz aktiváció volt az első lépés. A fluoreszcencia intenzitását az annealing-extension lépés végén mértük. Az olvadásgörbe elemzésével határoztuk meg az amplifikáció specificitását. Minden PCR-nél meghatároztuk a ciklusküszöböt (Ct-t) mely ahhoz a ciklushoz tartozik, melynél az amplifikációs görbe az alapvonalat keresztezte. A minták statisztikai különbségeinek felméréséhez (3 biológiai párhuzamos minden körülmény esetében) a Student *t*-tesztet használtuk.

## **A *Chlamydia trachomatis* D és E szerovariánsok szaporodásának vizsgálata chamber slide-okon**

16 mélyedéssel rendelkező, eltávolítható műanyag kamrás, speciális üveggel ellátott chamber slide-okat használtunk, HeLa sejt kultúra tenyésztéséhez melyeket azután *Chlamydia* fertőztünk. A sejt kultúrát a chamber slide-on  $4 \times 10^4$  sejt/mélyedés sűrűséggel 100 µl MEM táptalajban indítottuk. A slide-okat 1 óráig inkubáltuk szobahőmérsékleten a perem effektus csökkentése érdekében, majd egy éjszakán át 37 °C hőmérsékleten 5% CO<sub>2</sub> tartalmú légkör mellett a 90% sejt-konfluenciát értünk el. A fertőzéseket a fent leírtak alapján végeztük (A HEC hatásának vizsgálata *Chlamydia trachomatis* D és E szerovariánsok HeLa sejtekben történő tenyésztése) annyi különbséggel, hogy ebben az esetben csak a legmagasabb koncentrációjú HEC-et használtuk minden csoportnál. Röviden, az inokulumot 1,5% HEC pre-inkubáltuk 4.2 és 7.0 pH értéken, illetve a kontroll csoportot 4.2 és 7.0 pH értékű vaginális szimulánsban. A fertőzés 60 perc inkubáció 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> mellett, centrifugálás nélkül történt. A fertőzés után a sejteket kétszer mostuk PBS-sel, majd egy 0.1 µg/ml cycloheximide tartalmú médiumot adtunk hozzá. A 48 órás inkubáció után fixáltuk a sejteket melyet immunfluoreszcens festés követett. Az Alexa-647-vel jelölt anti-chlamydia LPS 1:200 arányú dilúciót használtunk a *Chlamydia* inklúziók festéséhez. A fluoreszcens jeleket az Axon GenePix Personal 4100A DNS chip szkennelvel és GenePix Pro (6.1 verzió) szoftverrel elemeztük, ahogyan korábban is publikáltuk. E kutatásban 4 biológiai párhuzamot értékeltünk minden kísérleti körülmény esetében.

## **A hidroxietil-cellulóz hatásának vizsgálata a *Chlamydia trachomatis* D szerovariáns szaporodására *in vivo* környezetben**

A HEC *in vivo* környezetben történő hatásának vizsgálatához 6-8 hetes nőtény BALB/c egereket 2.5 mg medroxiprogesteron-acetáttal kezeltünk 1 héttel a fertőzés előtt. Az egereket intra-vaginálisan beoltottuk  $1 \times 10^5$  *C. trachomatis* D szerovariáns inklúzió formáló egységével (IFU) és HEC keverékével (1.5% w/v), illetve a kontroll csoport esetében csak az adott mennyiségű inklúzióval, HEC nélkül. 3 nap után a cervico-vaginális mikrokörnyezetet vizsgáltuk ki, cervico-vaginális mosások révén. Az egereket intra-vaginálisan kimostuk 100 µl SPG-vel. Ezt követte két fagyasztás-olvasztás ciklus, -80°C-on 45 percig fagyasztva, majd sejtrázaton olvasztva szobahőmérsékleten. Az utolsó lépés után a visszatenyészthető IFU-t kerek fedőlemezekon növesztett McCoy sejteken vizsgáltuk tradicionális immunfluoreszcens mikroszkópiával.

## **BALB/c és C57BL/6 egerek fertőzése *Chlamydia pneumoniae* és *Chlamydia muridarum*-mal és a tüdőszövetek feldolgozása**

A patogénmentes 6 hetes BALB/c egereket a Charles River Laboratoriestől (Magyarország) kaptunk, valamint a C57BL/6 egereket a BRC Animal Housétól (Szeged, Magyarország). Az egereket sztenderd állattenyésztési körülmények közt tartottuk a Szegedi Tudományegyetem Mikrobiológiai Tanszék állatházában, ad libitum vízzel és élelmiszerrel. Fertőzés előtt az egereket enyhén szedáltuk 200 µl nátrium-pentobarbitál (7.5 mg/ml) tartalmú intraperitoneális injekcióval, majd intra-nazálisan fertőztük őket  $4 \times 10^5$  IFU *C. pneumoniae* (BALB/c) vagy  $1 \times 10^3$  IFU *C. muridarum* (BALB/c és C57BL/6) 20 µl SPG pufferben. A kontroll egereket csupán 20 µl SPG pufferrel kezeltük. 7 nappal a fertőzés után az egereket elaltattuk és fölálodztuk. A tüdőt eltávolítottuk és savval tisztított tengeri homokkal homogenizáltuk. Minden homogenizált tüdő felét feldolgoztuk teljes RNS extrakció céljából, a másik felet pedig felfuszpendáltuk 1 ml SPG-ben az életképes *Chlamydia* visszatenyésztésének céljából, illetve a triptofán származékok mennyiségének méréséhez. Mindkét csoportból három egér tüdőt fixáltunk 10% semleges pufferelt formalin oldatban (Sigma) kórszövetteni kiértékelés céljából. Minden kísérletet jóváhagyott a Szegeti Tudományegyetem Állatjóléti Bizottsága, e mellett megfelel az Európai Parlament 2010/63/EU irányelvnek.

### ***Chlamydia pneumoniae* és *Chlamydia muridarum* tenyésztése BALB/c egér tüdőkből**

Minden egyes egérből a homogenizált tüdőt centrifugáltuk (10 perc, 400g), majd a felülúszó sorozatos hígításaival fertőztük a McCoy sejtenyészetet és centrifugáltuk (1 h, 800g). 48 óra inkubáció után a sejteket acetonnal rögzítettük, majd monoklonális anti-chlamydiás LPS antitesttel és FITC-jelölt anti-egér IgG-vel festettük. A visszatenyészthető *Chlamydia* inkúziókat UV mikroszkóp alatt számoltuk és IFU/tüdő formában rögzítettük.

### **Indolamin 2,3-dioxigenáz inhibíció 1-metil-DL-triptofán által a BALB/c egerekben**

Hét nappal a *C. muridarum*-mal történő fertőzés előtt a 8 hetes nőstény egerek (n=4) ivóvizét megváltoztattuk 2 mg/ml IDO gátló 1-metil-DL-triptofán (1-MT) tartalmúra, melyet 10 mmol/l NaOH-ban oldottunk és Stevia édesítővel egészítettünk ki. A kontroll egerek (n=4) a Steviával édesített ivóvizet kapták 10 mmol/l NaOH-val, 1-MT nélkül. Az oldatot fénytől védett autoklávozott, vizes flakonokban adtuk az egereknek és naponta cseréltük. Az egerek fertőzése és a tüdőkből visszatenyészthető, életképes *C. muridarum* felmérése 7 nappal a fertőzés után a fent leírtak szerint zajlott.

### **Teljes RNS extrakció és cDNS szintézis a *Chlamydia*-val fertőzött és nem fertőzött BALB/c és C57BL/6 egér tüdőszövetekben**

A *C. muridarum* által fertőzött BALB/c egerek (n=3) és C57BL/6 egerek (n=5), valamint *C. pneumoniae* által fertőzött BALB/c egerek (n=3) és fertőzetlen kontroll egerek (n=3) homogenizált tüdőszövetéből extraháltuk az összes RNS-t, Tri Reagent-tel a gyártó által előírt protokoll szerint (Sigma). A teljes RNS (OD260) mennyiségét és (OD260/280) tisztaságát NanoDrop spektrofotométerrel határoztuk meg.

### **Az IDO1 és IDO2 RNA-Seq adatok validálása kvantitatív PCR-rel**

A Maxima Reverse Transcriptase használatával az összes RNS-ből 1 µg-ot visszaírtunk a gyártó által előírt protokoll szerint random hexamer priminggal a qPCR elvégzéséhez. A qPCR-t a Bio-Rad CFX96 real-time systemben végeztük. A qPCR-t SsoFast EvaGreen qPCR Supermix master mix segítségével végeztük, az egér specifikus primer párok pedig *IDO1*: 5'-GCTTCTTCCTCGTCTCTATTG-3', 5'-TCTCCAGACTGGTAGCTATGT-3'; *IDO2*: 5'-CCTGGACTGCAGATTCCTAAAG-3'; 5'-CCAAGTTCCTGGATACCTCAAC-3'; *beta-actin*: 5'-TGGAAATCCTGTGGCATCCATGAAAC-3', 5'-TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG-3' voltak. Az amplifikáció specificitása ellenőrzéséhez a qPCR után olvadásgörbe elemzést végeztünk. Ct számítást végeztünk az IDO1, IDO2, valamint béta-aktin génekhez,



majd a normalizált génkifejeződést a  $\Delta Ct$  ( $Ct_{IDO1}-Ct_{actin}$  or  $Ct_{IDO2}-Ct_{actin}$ ) módszerrel határoztuk meg. A qPCR adatok statisztikai összehasonlítását a fertőzetlen és fertőzött tüdőminták (n=3)  $\Delta Ct$  értékének összehasonlításával, Student t-tesztel végeztük, ahogyan korábban is leírtuk.

## **Herpesz szimplex virus-2**

A HSV-2 vírust (melyet Dr. Mucsi Iona, Szegedi tudományegyetem, Szeged, Magyarország adományozott) Vero sejteken szaporítottuk, a titerét pedig ugyanabban a sejtvonalban határoztuk meg plakk-titrációs módszerrel.

## **3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) analízis**

MTT analízist végeztünk az 1-3 és 5-8 vegyületek legmagasabb nem-toxikus koncentrációjának azonosításához, melyek még potenciálisan antivirális aktivitása mutattak a Vero sejteken.

## **Antivirális aktivitás tesztelése**

A homoktövisből nyert vegyületek antivirális aktivitását Vero sejteken vizsgáltuk. A 96-mélyedékes lemezekben növesztett sejteket fertőztük 0.01 multiplicitású (MOI) HSV-2-vel. 1 órás abszorpciós periódus után eltávolítottuk az inokulumot, a kultúrákat kétszer mostuk, majd hozzáadtuk a növényi vegyületeket különböző koncentrációban tartalmazó médiumot. 24 órás inkubációs periódus után a kultúrákat PBS-sel mostuk, majd 100 mL MQ-t adtunk a sejtekhez. Ezt követte kettő gyors fagyasztás-olvasztás ciklus, majd a sejtek lízise.

## **Az antivirális aktivitás mérése qPCR módszerrel**

A fertőzött sejtekből a templát DNS kinyerését két fagyasztás-olvasztás ciklussal értük el. 1  $\mu$ L lizátumot közvetlenül használtuk templátként a qPCR méréseknél. Minden minta 3 biológiai párhuzamost foglalt magába. A qPCR méréseket Bio-Rad CFX96 real time systemmel végeztük, ahogyan korábban is írtuk. Röviden, egy HSV-2 gD2 génspecifikus primer párt alkalmaztunk a qPCR folyamatban. A primer szekvenciák az alábbiak voltak: gD2: 50-TCA GCG AGG ATA ACC TGG GA-30, 50-GGG AGA GCG TAC TTG CAG GA-3'. A qPCR keverék az alábbiakból állt: 5  $\mu$ L SsoFast™ EvaGreen® Supermix, 1-1  $\mu$ L forward és reverse primer (10 pmol/mL mindegyikből) és 1  $\mu$ L templát, e mellett 2  $\mu$ L MQ vizet adtunk hozzá a 10  $\mu$ L végleges űrtartalom eléréséhez. 10 perc 95 °C-on történő polimeráz aktiváció után 40 PCR ciklus következett: 20 másodperc 95 °C-on, valamint 1 perc 64 °C-on. A fluoreszcencia intenzitását az annealing-extension lépés végén mértük. Az amplifikáció specificitást olvadásgörbe analízissel végeztük. Minden PCR-nél az amplifikációs görbe és a bázisvonal metszéspontjával határoztuk meg a ciklusnak megfelelő Ct-t.

## **A TCID<sub>50</sub> meghatározása vírushozam redukciós technikával**

A fertőzött és növényi vegyülettel kezelt Vero sejtek vírus hozamát tradicionális hígítási módszerrel határoztuk meg. A Vero sejteket (60,000 sejt/mélyedés) tenyésztettük 96-mélyedékes lapos aljú lemezekben 24 óráig 37 °C-on 5% CO<sub>2</sub> körülmények között a szemikonfluens sejtréteg megjelenéséig. Ezután a médiumot eltávolítottuk és hozzáadtunk a 10-szeres hígítási sorozatú HSV-2-t, a kontrol csoportban értelemszerűen a növényi vegyületek nélkül, a kezelt csoportban pedig a növényi vegyületekkel együtt. Mindegyik csoportból 4 biológiai párhuzamos készült. A lemezeket 37 °C-on 48 óráig inkubáltuk a tipikus citopátiás hatás (CPE) megjelenéséig. A vírus CPE-jét inverz mikroszkóp alatt vizsgáltuk, majd a vírus titereket Reed Muench módszerrel határoztuk meg, TCID<sub>50</sub>/ml-ben kifejezve. A teszt vegyületek antivirális aktivitását a vegyületek

jelenlétében lévő vírusos titer redukciójaként mértük ( $\log_{10}$ ) a kontroll mintában található vírus titerrel összehasonlítva.

## **EREDMÉNYEK**

### **A hidroxietil-cellulóz *Chlamydia trachomatis* D és E szerovariánsok szaporodására kifejtett hatásának monitorozása kvantitatív PCR-rel**

Miután pre-inkubáltuk a *C. trachomatis* EB-eket 4.2 pH értékű vaginális fluidumban, 48 órával később qPCR mérést végeztünk, ami arra mutatott, hogy a HEC koncentráció-függő módon növeli a *Chlamydia* szaporodását. A *C. trachomatis* D szerovariáns növekedésének maximális emelkedése 23.7-szeres volt a maximális 1.5% w/v HEC koncentrációnál, illetve egy észrevehető, de nem szignifikáns emelkedési tendenciát észleltünk 0.188% w/v HEC koncentrációig. A HEC pH 7-en jelentősen, 13.8-szorosan emelte a *Chlamydia* növekedését 1.5% w/v koncentrációnál. Érdekes módon, a *C. trachomatis* E szerovariánsnál a maximális növekedési ráta (22.25-szörös 4.2 pH értéknél és 26.1-szeres 7 pH-en) a második legmagasabb HEC koncentrációnál (0.75% w/v) figyeltünk meg mind 4.2 és 7 pH értéknél, mely arra utal, hogy különböző a HEC-EB interakció a szerovariánsoknál.

### **A hidroxietil-cellulóz *Chlamydia trachomatis* D és E szerovariánsok szaporodására kifejtett hatásának monitorozása chamber slide-okon**

A qPCR eredmények megerősítésének érdekében, *Chlamydia* inklúzió számolást végeztünk a ChlamyCount mérési rendszerrel 4.2 és 7 pH értékeken, 1.5% w/v és 0.75% w/v HEC koncentrációval a D és E szerovariánsoknál. Az inklúzió mérések hasonló, de alacsonyabb növekedési emelkedést mutattak a qPCR mérésekhez képest. Mindössze 5.9-től 6.5-szörös növekedést mutattak a D szerovariánsnál, illetve 5.95-től 6.05-szörös növekedést az E szerovariánsnál. A különbség valószínűleg abból fakad, hogy a ChlamyCount a chlamydiás inklúzió számot méri, míg a qPCR az inklúziók bakteriális genom tartalmát.

### **A hidroxietil-cellulóz *Chlamydia trachomatis* D szerovariáns szaporodására kifejtett hatásának vizsgálata *in vivo***

Az *in vivo* adatok is kimutatták, hogy a HEC jelentősen megemelte a *C. trachomatis* D szerovariáns szaporodását az egér genitális traktusában. A növekedés 2.57-szeres volt 3 nappal a fertőzés után. Fontos megjegyeznünk, hogy a *Chlamydia* EB-k nem voltak pre-inkubálva HEC-vel a fertőzés előtt, mely a HEC azonnali növekedésserkentő hatására utal *in vivo*.

### ***Chlamydia* fertőzés és *Chlamydia* által előidézett kórszövetten a BALB/c egér tüdőszövetben**

Állat modellünkben, fajonként eltérő mennyiségű *Chlamydia*-val fertőztünk ( $4 \times 10^5$  IFU *C. pneumoniae* és  $1 \times 10^3$  IFU *C. muridarum*). Korábbi kísérleteink eredményei azt mutatták, hogy az alacsonyabb dóziszú *C. muridarum* egér patogén hasonló növekedés serkentést és kórszövetten okozott, mint a magasabb dóziszú *C. pneumoniae* humán kórokozó. Valóban, a *C. muridarum* és *C. pneumoniae* által fertőzött BALB/c tüdőkből hasonló mennyiségű volt a visszatenyészthető inklúziók száma 7 nappal a fertőzés után. Mindkét fertőzés limfoid hiperpláziát okozott, nyirok felhalmozódással, valamint plazmocitoid sejtek és makrofágok felhalmozódásával a kiszélesedett hörgő falakban. A fertőzés ezen stádiumában a neutrofilok jelenléte marginális, a fő leukocita populációk limfociták és makrofágok. A kontroll tüdőszövet alveoláris válaszfala vékony maradt, gyulladást okozó sejtek egyértelmű jelenléte nélkül, viszont kis számú pulmonáris makrofágot észleltünk.

## **A *Chlamydia muridarum* fertőzés hatása a globális gén expresszióra a BALB/c egér tüdőszövetben**

Az egér *Chlamydia* faj által szövetszinten előidézett globális génkifejeződés változások felméréséhez Illumina next generation RNS szekventálást végeztünk a *C. muridarum* által fertőzött egér tüdőkön 7 nappal a fertőzés után. Az RNA-seq analízis arra mutatott, hogy 755 gén nagyobb mennyiségben fejeződött ki, valamint 251 gén kisebb mennyiségben fejeződött ki a fertőzött egerekben, mint a fertőzetlen kontrollban. A fokozódás mértéke, valamint a fokozott gének száma nagyobb volt (1.48-tól 345-szörös), mint a csökkentett gének esetében (1.5-től 14.36-szoros). A leginkább fokozott gén a *CXCL11* (*I-TAC*) volt, illetve számos citokin/kemokin az erősen fokozott gének közt volt, mint például a *CXCL9* (*MIG*), *CXCL10* (*IP-10*), *CCL8* (*MCP2*), *CCL2* (*MCPI*), *IFNG*, *IL21*, *IL10*, valamint a korábban említett védelmi gének: *IRG1*, *IIGP* és *IDO1*. A leginkább csökkentett gén *BC023719* cDNS szekvencia volt, 14.36-szoros csökkenéssel, a funkciójuk a legtöbb erősen csökkentett gének változó volt.

## **A *Chlamydia muridarum* fertőzés által indukálódott antimikrobiális gének BALB/c egér tüdőszövetben**

Egy jelentős Gén Ontológia kategóriát azonosítottunk, amely „GTP kötődési” funkcióval bíró gén. A legtöbb GTPáz ebben a kategóriában az intracelluláris kórokozók elleni védelmi reakciókkal foglalkozik. Gyakorlatilag mind a négy IFN által indukálható GTPáz osztályt fokozott mennyiségben találtuk meg, beleértve számos guanilát-kötő proteineket (*GBP2-9*, *GBP11*), a myxovírus rezisztencia protein-1 (*MX1*), immunitással kapcsolatos GTPázokat, mint a *IRGM1* (*LRG47*), *IRGM2* (*GTPI*), *IRGA6* (*IIGP*), *IRGM3* (*IGTP*), *IRGB6* (*TGTP1-2*), *IRGB10* (*Gm12250*) és egy nagyon jelentős IFN által indukálható GTPáz, a *GVIN1*.

## **Az *IDO1* és *IDO2* RNA-Seq adatok qPCR-rel történő validálása**

Igen váratlan volt, hogy az *IDO1* gén erősen fokozódott (24.76-szorosán) a fertőzött tüdőben, mivel eddigi adatok azt mutatták, hogy az *IDO1* nem indukálható *C. trachomatis* vagy *C. muridarum* fertőzés által *in vitro* az egér hámsejtekben vagy más sejtekben. Az *IDO1*-et egy jelentősen megváltozott géneként észleltük ( $P=0.037$ ) a *C. muridarum* által fertőzött és fertőzetlen minták közt, míg az *IDO2*-t nem mutatott szignifikáns változást. Ezzel szemben mind az *IDO1* és *IDO2* géneknek több kópiája volt a fertőzött mintákban, mint a fertőzetlenekben.

Az *IDO2* esetében viszont a kópia száma nem volt elég magas ahhoz, hogy szignifikáns változásként határozzuk meg. A qPCR méréseket független módszerként használtuk az RNA-Seq *IDO1* és *IDO2* adatok ellenőrzésére. E mellett ahhoz, hogy megvizsgáljuk, az *IDO1-2* indukció egyedülálló-e az egér *Chlamydia* fajtában, megmértük az *IDO1-2* génkifejeződést a *C. pneumoniae* által fertőzött tüdő mintákban. A qPCR adatok alátámasztották az RNA-Seq adatokat, miszerint a *C. muridarum* fertőzés esetében 20.38 +/- 11.3-szoros és 38.2 +/- 25.2-szeres *IDO1* és *IDO2* fokozódást mutatott. Továbbá a qPCR vizsgálatok 15.5 +/- 14.1-szeres és 88.9 +/- 73.9-szeres *IDO1* és *IDO2* fokozódást mutattak a *C. pneumoniae* által fertőzött tüdőszövetekben.

## ***IDO1-2* fehérje kifejeződése a *Chlamydia muridarum* és *Chlamydia pneumoniae* által fertőzött BALB/c egér tüdőszövetekben**

Mérsékelt *IDO1-2* pozitivitást észleltünk a bronchiális és időnként az alveoláris hámsejtek citoplazmáiban, valamint gyakran közepes/erős pozitivitást észleltünk a *C. pneumoniae* és *C. muridarum* által fertőzött egér tüdőszövetek makrofágjaiban. A *C. pneumoniae* és *C. muridarum* fertőzések hasonló *IDO1-2* pozitivitáshoz vezettek e sejtekben. A kontroll, fertőzetlen tüdőszövetek szintén tartalmaztak *IDO1-2* pozitív bronchiális hámsejteket, valamint kis mennyiségű *IDO1-2* pozitív makrofágot.

## **IDO1-2 aktivitás a *Chlamydia muridarum* és *Chlamydia pneumoniae* által fertőzött BALB/c egér tüdőszövetekben**

A kifejeződött IDO1 és IDO2 fehérjék funkcionalitásának meghatározásához HPCL analízist végeztünk a fertőzött és kontroll egér tüdő szöveteken, melyeket a génkifejeződési és immunhisztokémiai mérések esetén is használtunk. Az IDO1-2 aktivitást az össz triptofán szint, illetve a kinurenin szintjének mérésével határoztuk meg, mely a triptofán bomlási termékének egy intermediere. Az alkalmazott HPLC módszer nem talált kinurenint a fertőzetlen tüdőkből, míg a *C. trachomatis* és *C. pneumoniae* által fertőzött tüdők 369.6 +/- 199.8 nM és 508.7 +/- 176.6 nM mennyiségben tartalmazták. A triptofán szintek a fertőzött mintákhoz hasonlóak voltak: 2757.2 +/- 201.5 nM és 3054.1 +/- 418.1 nM volt a *C. trachomatis* és *C. pneumoniae* által fertőzött tüdőkből. A fertőzetlen egér tüdőkből kissé alacsonyabb volt: 1569.1 +/- 246.9 nM. Mivel a sejtszám nem volt meghatározott a fertőzött és kontroll szövetekben, a mintákat a kinurenin/triptofán arányokkal normalizáltuk a korábban leírt módszerrel. A kinurenin/triptofán arány 0.12-0.22 volt a *C. muridarum* által fertőzött mintákban, valamint 0.13-0.20 a *C. pneumoniae* által fertőzött mintákban, illetve 0 a kontroll mintákban. A *C. muridarum* növekedésére gyakorolt IDO aktivitás hatásának tanulmányozásához gátoltuk az IDO1-2-t 1-MT kezeléssel, melyet hét nappal a fertőzés előtt kezdtünk, majd hét nappal a fertőzés utánig folytattunk. Az 1-MT kezelés közepes, de szignifikáns, 1.98-szeres növekedéshez vezetett a *C. muridarum* fertőzés által visszatenyésztett IFU-ban 7 nappal a fertőzés után.

## **IDO1-2 mRNS kifejeződése és aktivitása a *Chlamydia muridarum* által fertőzött C57BL/6 egér tüdőszövetekben**

Hogy meghatározzuk a *Chlamydia* által indukált IDO1-2 aktivitás észlelhető-e másik egér fajban, qPCR és HPLC analízist végeztünk a *C. muridarum* által fertőzött és kontroll C56BL/6 egér tüdő szöveteken. A qPCR adatok jelentős IDO1 mRNS szintemelkedést mutattak a *C. muridarum* által fertőzött tüdőkből (a fokozódás mértéke: 8.14-től 13.88-szoros); e mellett, míg az IDO2 mRNS fokozódás nem volt szignifikáns, fokozódási tendenciát észleltünk (fokozódás mértéke: 1.71-től 21.49-szeres). A triptofán és kinurenin tartalom HPLC analízise azt mutatta, hogy a fertőzetlen C57BL/6 egér tüdők kis mértékű kinurenint tartalmaztak (0.045-től 0.075-ig kinurenin/triptofán koncentrációs arányok), valamint a *C. muridarum* fertőzések jelentősen emelték az IDO aktivitást (0.185-től 0.773-ig kinurenin/triptofán koncentrációs arányok).

## **Az 1-3 és 5-8 vegyületek antivirális aktivitása**

Az 1-3 és 5-8 számú vegyületek citotoxicitását 100-0.78  $\mu\text{M}$  koncentrációnál mértük. Az összes vegyületet feloldottuk DMSO-ban, majd médiumban hígítottuk. A Maximális DMSO koncentráció nem mutatott citotoxicitást a Vero sejteknél. 24 órás inkubáció után a sejtek életképességét MTT teszttel határoztuk meg. A vegyületek 100  $\mu\text{M}$  feletti  $\text{CC}_{50}$  értéket mutattak, kivéve a 8 számú vegyület esetében, mely erősen toxikus volt a Vero sejtek számára, 6.25  $\mu\text{M}$   $\text{CC}_{50}$  értékkel. Tradicionális vírus hozam redukciós mérések alkalmazásával az 1 és 3 számú vegyületek 2  $\log_{10}$  és 3.49  $\log_{10}$  redukciót okoztak a HSV-2 hozamban 12.5  $\mu\text{M}$  koncentrációnál a kezeletlen kontroll minták vírus titeréhez képest. Ez az észrevétel megegyezik a szakirodalomban található adatokkal, melyek azt mutatják, hogy az acyclovir, mely az anti-HSV terápia etalonja, 1-5.06  $\log_{10}$  HSV-2 redukciót okoz 6.25  $\mu\text{M}$  koncentrációnál. A 2 számú vegyület csak 50  $\mu\text{M}$  vagy magasabb koncentrációnál mutatott antivirális aktivitást. A musizin (5) antivirális aktivitással bír 12.5  $\mu\text{M}$  koncentrációnál, 2.33  $\log_{10}$  redukciót okozva a vírus hozamban. A musizin (5) kísérleteinkben demonstrált HSV-2-ellenes hatása összhangban van Geschler et al. eredményeivel, melyek e vegyület HSV-1-ellenes aktivitásáról nyilatkoztak. Eredményeink megerősítéséhez direkt qPCR módszert használtunk, hogy meghatározzuk a HSV-2 növekedésének inhibícióját, melyet a vírussal fertőzött sejtekben lévő vegyületek sorozatos hígításával értünk el. A vírus hozam redukciós mérésekből szerzett eredményeinkhez hasonlóan a qPCR eredményekből szerzett inhibíciós görbék azt mutatták, hogy az 1 és 3 számú vegyületek a

leghatékonyabbak a HSV-2 ellen. A maximális HSV-2 növekedés a Ct ~15 mértékű DNS koncentrációnak felelt meg a direkt qPCR mérésekben. Az a vegyület koncentráció, amely a HSV-2 növekedését, és a megfelelő DNS tartalmat 50%-kal (IC<sub>50</sub>) csökkentette, a qPCR Ct értéket körülbelül egy ciklussal növelte. E mellett az a vegyület koncentráció, mely a HSV-2 növekedését 90%-kal (IC<sub>90</sub>) gátolta, a Ct értékek alapján ~3.32 ciklussal növekedett. Az 1 és 3 számú vegyületek esetében az IC<sub>50</sub> és IC<sub>90</sub> értékek 6.25 and 12.5 µM között voltak, míg a 2 számú vegyület IC<sub>50</sub> értéke ~25 µM volt, IC<sub>90</sub> értéke pedig 25 és 50 µM közt volt. A musizin (5) szintén erős antivirális aktivitást mutatott ~12.5 µM értékű IC<sub>50</sub>-el, illetve 25-50 µM IC<sub>90</sub>-el. A torachryson-8-O-glükozid (7) nem gyakorolt hatást a HSV-2 növekedésére az alkalmazott koncentrációs távon belül, míg a musizin-8-O-glükozid (6) IC<sub>50</sub> értéke ~25 µM volt, IC<sub>90</sub> értéke pedig 50 és 100 µM közt volt. A 2-methoxystipandron (8) nem mutatott antivirális hatást a nem-toxikus 6.25 µM koncentrációnál.

## TÁRGYALÁS

### 1. cél:

Érdekes módon eredményeink eltérnek Slater et al. eredményeitől, aki a *C. trachomatis* L2 típusú lymphogranuloma venereum fajtát használva a HEC koncentráció- és pH-függő gátló hatását demonstrálta a *Chlamydia in vitro* növekedése kapcsán. Azonban számos jelentős különbség van a két tanulmány közt, mint például az, hogy mi komplex puffert használtunk, mely jobban demonstrálja a vaginális fluidum fizikokémiás tulajdonságait, mint a Slater et al. által használt foszfát és acetát pufferek. Továbbá megfigyeltük a 1.5-0.75% w/v (15000-7500 g/ml) HEC koncentrációk növekedést serkentő hatását. Ezek a koncentrációk azok, amelyek jellemzők a vaginális gélekre, míg Slater et al. jelentősen alacsonyabb HEC koncentrációkat használt (2-200 g/ml). Az L2 szerovarins helyett mi a gyakoribb urogenitális előfordulású D és E szerovariánsokat vizsgáltuk. Annak ellenére, hogy a *C. trachomatis* D és L2 szerovariánsok közt csupán kisebb genetikai különbségek vannak, számos fenotipikus különbség van a két szerotípus közt. Korábbi tanulmányok arra utaltak, hogy a hámsejtekkel való korai interakcióik különbözőek, illetve arra, hogy a gazda hámsejtek centrifugálása és dextrán előkezelése megnövelte az urogenitális *C. trachomatis* szerovariánsok fertőzésének hatékonyságát, viszont az L2 szerovariánsra nem volt hatással. Továbbá az E szerovariáns heparin független, míg az L2 fertőzés erős heparin függőséget mutat. Mivel valószínűleg a HEC hatással van az EB-k és a gazda sejtek közötti interakciókra, ez a hatás különböző lehet az LGV és urogenitális szerovariánsok esetében. Tanulmányunk összességében arra mutat, hogy a vaginális gél összetevői, mint a HEC gélképző ágens, jelentős növekedést serkentő hatást gyakorolnak két jelentős *C. trachomatis* urogenitális szerovariánsra. Ezt a serkentő hatást megfigyeltük *in vitro* széles pH skálán, alacsonyabb koncentrációknál, illetve *in vivo*. Mivel a növekedést serkentő hatás elméletileg csökkentheti a fertőzés továbbadásához szükséges baktériumszámot, eredményeink arra utalnak, hogy további tesztelés szükséges jelenlegi és jövőbeli vaginális gélek kapcsán, hogy meghatározzuk a *C. trachomatis* és más nemi úton terjedő kórokozók szaporodására gyakorolt serkentő hatásukat.

### 2. cél:

A *C. muridarum* által fertőzött tüdők RNS szekvenálásos analízise arra mutat, hogy számos különböző gazdagén kifejeződése megváltozott, illetve számos up-regulált gén hozzájárulhat a *Chlamydia* által okozott gyulladáshoz és az egér *Chlamydia*-ellenes reakciójához. Megtaláltuk, mind a természetes és az adaptív immunitáshoz kapcsolódó gének nyomait a *C. muridarum* által fertőzött tüdőszövetben. A főbb funkcionális csoportok a citokin/kemokin kifejeződéshez, kemotaxis, jel transzdukció, antigén prezentáció, sejtosztás és a természetes immunitás által létrejövő antimikrobiális védelemhez tartoztak. A chlamydiás kórélettan sejtelmélete alapján nem hivatásos immun sejtek váltják ki a gyulladást a gyulladáskeltő citokinek és kemokinek kiválasztásával. Míg a citokinek/kemokinek sejtforrása nem azonosítható szövetszintű génkifejeződés analízissel, *in toto* a kemotaxis indukció és celluláris influx erős génkifejeződési lenyomata azonosítható a *C. muridarum* által fertőzött egértüdőkben. A kiválasztott citokinek autokrin-parakrin hatásai, illetve a rezidens és új sejtek közti interakciók egy olyan miliót eredményezhetnek, mely komplex génkifejeződést indukál, egyes *Chlamydia*-ellenes géneket beleértve.

Az IFN által indukálható GTPázok családjának számos tagját nagy számban megtaláltuk. Bár nem mértünk a *C. pneumoniae* által okozott génkifejeződési változásokra, korábbi tanulmányok azt mutatták, hogy mind az egér és emberi *Chlamydia* fajták képesek előidézni az IFN által indukálható GTPázokat. Az új GTPáz gének is erősen fokozottak voltak a *C. muridarum* fertőzés után, valamint szerepet játszhatnak a *Chlamydia*-ellenes védelemben. Összességében az IFN által indukálható GTPázok differenciális érzékenysége magyarázhatja azt, hogy míg a *C. pneumoniae* 400-szor több IFU-t használ a *C. muridarum*-nál, mégis hasonló IFU-kat nyertünk vissza a fertőzött tüdőkből. Az *iNOS*, mely egy másik ismert *Chlamydia*-ellenes gén, szintén fokozódott (14-szeresen). Bebizonyosodott, hogy az *iNOS* indukció fontos mechanizmus az egér genitális szervrendszerében jelenlévő *C. muridarum* fertőzés megsemmisítésének későbbi fázisában, illetve a RAW 264.7 egér makrofágokban. Az *IRG1*, mely egy másik IFN által indukálható gén, szintén erősen fokozott volt (252.7-szeresen) a *C. muridarum* fertőzés után. A *MIG*, mely egy CXC kemokin, szintén erősen fokozott volt (127-szeresen) a *C. muridarum* fertőzés után. Érdekes módon, a CXC kemokinek mérete, kationos töltése és amfipatikus jellege hasonlít egyes antimikrobiális peptidkére. Korábbi kísérleteink megmutatták, hogy a *MIG* koncentrációfüggő, közvetlen toxicitással rendelkezik a *C. muridarum*, *C. trachomatis* és *C. pneumoniae* elemi részeire.

Az RNS szekvenálás és qPCR tesztek megerősítették, hogy az IDO1 és IDO2 gének szintén jelentős mértékben indukálódtak a fertőzött tüdőben. Az IDO aktivitás azonosításához IDO1-2 IHC-t végeztünk a fertőzött és kontroll tüdőszövetekben. Ezek révén észleltük, hogy a tüdő bronchialis hámsejtjeiben közepes mértékű IDO1-2 pozitivitás volt mind a kontroll és fertőzött tüdőben, mely alacsony szintű, stabil-állapotban történő kifejeződésre utal. Magasabb szintű IDO1-2 pozitivitást észleltünk a leukocitákban, különösképpen a makrofágokban, mind a fertőzetlen és fertőzött szövetekben, viszont a pozitív sejtek száma magasabb volt a *Chlamydia* által fertőzött szövetekben. Lehetséges, hogy a magasabb számú IDO1-2 pozitív makrofágok az *in situ* IDO1-2 indukciónak és/vagy a már jelenlévő IDO1-2 pozitív monociták, gyulladás alatt lévő szövetbe való beáramlásának eredményei. Az is lehetséges, hogy az IDO1-2 pozitív makrofágok lokálisan aktiválódtak, mely magasabb mértékű IDO1-2 aktivitást eredményezett. Génkifejeződési adataink alapján az egyik legfontosabb *C. muridarum* által indukált hálózat az IFN jelátviteli útvonal, tehát az IFN hatása az IDO1-2 gén indukcióra egyértelműen jelen van a *Chlamydia* által fertőzött szövetekben. A kinurenin nevű triptofán bomlástermék HPLC detekciója azt demonstrálta, hogy a fertőzetlen egér tüdőszövetekben nem volt észlelhető IDO aktivitás, ebből fakadóan a fertőzetlen hámsejtben és makrofágokban észlelt alacsony szintű IDO1-2 protein pozitivitás nem okozott jelentős triptofán katabolizmust, illetve az IDO1-2 enzimek indukáltak és funkcionálisan aktívak voltak mind az egér és humán *Chlamydia* által fertőzött tüdőszövetekben. Kvantitatív ICH-t nem végeztünk, viszont a hámsejtben lévő IDO1-2 IHC pozitivitás fertőzés előtti és utáni megfigyelése arra utal, hogy az IDO1-2 nem volt indukálva és az IDO1-2 aktivitás lehetséges, hogy nem vesz részt a *Chlamydia* egér tüdőszövetekből való megsemmisítésében. További kvantitatív kutatás szükséges az egér hámsejt IDO kifejeződésének pontos szerepének azonosításához. Az a tény, hogy a C57BL/6 egér tüdő szintén mutattak *Chlamydia* fertőzés által indukált IDO aktivitást, azt a lehetőséget támasztja alá, hogy a megfigyelt IDO indukció nem egy egerekre specifikus reakció.

Kutatásainknak vannak korlátai, melyek további vizsgálatokat igényelnek. Nem tudunk IDO1-2 indukciót mérni a hámsejtben, viszont az alkalmazott IHC nem volt kvantitatív módszer. Mivel a hámsejtben zajlik a *Chlamydia* replikáció, a tüdő hámsejt izolációja, stabil állapotuk és a fertőzés által indukált IDO aktivitásuk mérése kritikus pontokat jelentenek és jelenlegi célunkat képzik. További célunk az IDO aktivitás felmérése, izolált fertőzött és fertőzetlen egér urogenitális szervek hámsejtjeiben. Az IDO2 szerepe nincs meghatározva. A tüdő IDO2 mRNS-ét egyértelműen a *Chlamydia* fertőzés okozta, viszont RNA-szekvenciák száma jelentősen alacsonyabb volt, mint az IDO1 szekvenciák száma. Az IDO2 szerepének felméréséhez az izolált tüdő hámsejtben és makrofágokban lévő IDO2 fehérje koncentrációkat kell lemérnünk és összehasonlítani az IDO1-el. Továbbá az IDO kémiai inhibíciója jelentős, ám korlátozott fenotipikus hatással bír. Ennek oka lehet az IDO1-2 korlátozott védelmi szerepe, vagy az enzimek részleges inhibíciója. További, optimalizált IDO inhibíciós protokollal és fertőzés utáni időponttal rendelkező tanulmányok szükségesek.

A *Chlamydia* képes kikerülni az intracelluláris védelmi reakciókat egy metabolikus shunt révén, mely kikapcsolja az effektor fehérjét mint az IFN-indukálható GTPázok, vagy az intracelluláris effektorok indukálásának kikerülésével. *In vivo* kutatásunk azt mutatta, hogy sejt szinten számos antibakteriális mechanizmus bekapcsolódik és az IDO1-2 ezen effektor repertoárhoz tartozhat.

### 3. cél:

Egyes szeszkviterpének (1, 2), továbbá a fenilpropán-dimer (3), a naftalének (5-7), és a 14-naftokinon (8) vegyületek melyek az *E. rhamnoides* (1-3) és az *R. aquaticus* (5-8)-ból származnak, dóziszfüggő gátló hatását vizsgáltuk a HSV-2 vírussal szemben, tradicionális vírushozam redukción tesztel, valamint qPCR módszerrel. Bebizonyosodott, hogy az 1 és 3 számú vegyületek, valamint a musizin (5) hatékony HSV-2 aktivitással rendelkeznek. A glükozidokat illetően, mint például a musizin-8-O-glükozid (6), csupán mérsékelt HSV-2 ellenes aktivitást tapasztaltunk. Tanulmányunk jelentős újításai közé tartozik két új 14-noreudesmane szeszkviterpén (1, 2) izolációja homoktövisből, illetve a növény kérgében jelenlévő számos vegyület antivirális tulajdonságainak demonstrálása. Eredményeink alapján a homoktöviset érdemes további kutatások alá vetni, mivel komoly HSV-2 elleni hatásokkal bíró anyagok potenciális forrása lehet, így alternatív gyógyszer jelöltté válhat az acyclovir- és penciclovir-rezisztens vírusfajtákkal fertőzött populáció kezelésében.

## TÉZISPONTOK

1. cél: A HEC gélképző ágens szignifikáns szaporodást serkentő hatásokkal bír két gyakori előfordulású *C. trachomatis* urogenitális szerovariáns esetében. Ezt a serkentő hatást megfigyeltük *in vitro* széles pH skálán, alacsonyabb koncentrációknál, illetve *in vivo*. Mivel a növekedést serkentő hatás elméletileg csökkentheti a fertőzés továbbadásához szükséges baktériumok számát, eredményeink arra utalnak, hogy további tesztelések szükségesek a jelenlegi és a jövőbeli vaginális gélek esetében is, hogy meghatározzuk a *C. trachomatis* és más nemi úton terjedő kórokozók szaporodására gyakorolt hatásaikat.

2. cél: Két különböző *Chlamydia* fajta általi fertőzés esetében, a BALB/c egér tüdőjében jelentős IDO 1-2 kifejeződés volt észlelhető a többi védelmi génhez képest. Ez új, mivel az IDO-ról eddig úgy gondoltuk, hogy kizárólag humán *Chlamydia*-ellenes védelmi gén. Az IDO 1-2 aktivitás szintén megnőtt a C57BL/6 tüdőszövetekben, mely arra utal, hogy ez a jelenség nem egér specifikus.

3. cél: Három *E. rhamnoides*-ből kivont vegyület közül kettő erős HSV-2 ellenes hatással bír: az 1 számú (szeszkviterpén) és 3 számú (fenilpropán-heterodimer) vegyületek. A *R. aquaticus*-ból kivont 5 számú vegyület (muscisin) nagyon potens HSV-2 ellenes aktivitást mutatott, míg a 6 számú vegyület (musizin-8-O-glükozid) mérsékelt HSV-2 ellenes aktivitással bír.

## ÖSSZEGZÉS

A szexuális úton terjedő betegségek folyamatos problémát jelentenek világszerte. Naponta több mint egymillió ember fertőződik meg valamilyen szexuális úton terjedő kórokozóval, és ezeknek a megbetegedéseknek az incidenciája többségében növekvő tendenciát mutat. A szexuális úton terjedő kórokozók közül a *C. trachomatis* az egyik leggyakoribb.

A *C. trachomatis* urogenitális szerovariánsainak fertőzőképességét jelentősen befolyásolhatják a vaginális gélek. A HEC az egyik leggyakrabban használt gélképző ágens a vaginális gélekben. *In vivo* és *in vitro* környezetben is megvizsgáltuk a HEC *C. trachomatis* D szerovariánsára gyakorolt hatását. Szignifikáns növekedést serkentő hatást tapasztaltunk, mind az *in vitro* és *in vivo* kísérleteink esetében. Ezt megerősítve, a *C. trachomatis* E szerovariánsát is megvizsgáltuk *in vitro* kísérletben és ezen szerovariáns esetében is szignifikáns növekedést serkentő hatást tapasztaltunk.

A *Chlamydia* fertőzések védőoltásokkal történő megelőzése hatékonyan csökkenthetné a fertőzések előfordulását. A *Chlamydia*-ellenes védőoltások kifejlesztésénél többnyire egérmodelleket használnak a fertőzéssel kapcsolatos immunválasz és a hisztopathológia tanulmányozása céljából. Ezért fontos kérdés, mind az egér és emberi *Chlamydia* szerotípusok esetében, az eliminálásukban szerepet játszó egér gének *in vivo*

azonosítása. A *C. muridarum* által megfertőzött BALB/c tüdő transzkriptom analízise azt mutatta, hogy számos közvetlen *Chlamydia*-ellenes gén szövetszinten nagymértékben kifejeződik, mint például az interferon- indukált GTPáz család, a CXCL kemokinek közül a *CXCL9* és *CXCL11*, az immunoresszponzív gén-1, *iNOS2* és *lipocalin-2*. Az *IDO1-2*, melyeket korábban hatékony *Chlamydia*-ellenes gazdaszejt enzimekként írtak le, szintén nagymértékben kifejeződtek a fertőzött egértüdőkben. Ez egy új megfigyelés, mivel az *IDO* korábban kizárólag humán *Chlamydia*-ellenes génnek számított. Az alacsonyabb hámsejti pozitivitás mellett az immunohisztokémia azt mutatta, hogy az *IDO1-2* fehérjék nagymértékben jelentek meg a makrofágokban. Az *IDO* működésének jele a triptofán bomlástermék kinurenin megjelenése. A kinurenin szint növekedése azt igazolta, hogy az *IDO1-2* proteinek nemcsak fokozott mértékben termelődtek, hanem funkcionálisan aktívak is voltak. Az *IDO1-2* génexpresszió és aktivitás szintén megnövekedett a *C. muridarum* által fertőzött C56BL/6 tüdőszövetekben, mely arra utal, hogy ez a jelenség nem egértörzsrre specifikus. Végezetül, az *IDO* gátlás hatására a *C. muridarum* szaporodása szignifikánsan megnövekedett BALB/c egértüdőben azt bizonyítva, hogy aktív szerepük lehet a *Chlamydia* fertőzés eliminálásában.

A HSV-2 egy másik jelentős, szexuális úton terjedő kórokozó. Több terápiás szer is használatban van a HSV-2 fertőzések kezelésére, de a gyógyszer-rezisztens mutánsok megjelenése miatt további fejlesztések szükségesek. Potenciálisan új antivirális vegyületek azonosítása céljából megvizsgáltuk a homoktövis terméséből kivont vegyületek *in vitro* antivirális hatását a HSV-2 ellen. A tradicionális vírushozam redukációs teszt és qPCR módszerek alkalmazásával azt az eredményt kaptuk, hogy *E. rahmniodes*-ből kivont két vegyület is hatékony HSV-2-ellenes aktivitással bír: az 1. számú vegyület (szeszkviterpén) és a 3. számú vegyület (fenilpropán-heterodimer). Az *R. aquaticus*-ből kivont 5. számú vegyület (musizin) nagyon hatékony HSV-2-ellenes aktivitással bír, míg a 8. számú vegyület (musizin-8-O-glicoside) közepes HSV-2-ellenes aktivitással rendelkezett.

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Első sorban szeretném megköszönni mentoromnak **Dr. Virok Dezsőnek** a folyamatos segítséget Ph.D tanulmányaim és a hozzá kapcsolódó kutatások során, a türelmét, az általa kapott motivációt és hatalmas mennyiségű tudást.

Őszinte köszönetemet szeretném jelezni **Dr. Burián Katalinnak**, a Mikrobiológiai Tanszék vezetőjének, aki lehetőséget adott arra, hogy a tanszéken dolgozzak, és hozzáférést biztosított a laboratóriumhoz és kutatási eszközökhöz.

Köszönetemet szeretném jelezni **Dr. Endrész Valériának** a segítségéért, tanácsaiért, jeles hozzászólásaiért és bátorításáért, melyek révén arra ösztönzött, hogy több szempontból is szélesítsem kutatásom.

Jelen Ph.D dolgozat nem lett volna lehetséges **Deák Györgyi, Ürmös Kitti, Váradi Anikó** és **Urbán Szilvia** segítségével és hozzájárulása nélkül.

Szeretném megköszönni munkatársaimnak: **Dr. Lantos Ildikónak**, **Dr. Kókai Dávidnak** és **Dr. Varga-Bogdanov Anitának** az elmúlt három évben történt sok eszmecsereért és jókedvet.

Köszönettel tartozom **Vatai Dávidnak** dolgozatom és a hozzá kapcsolódó szövegek fordításáért és lektorálásáért.

Szeretném köszönetemet jelezni családomnak, szüleimnek és húgomnak a lelki támaszért, melyet a jelen dolgozat megírása közben és egész életem folyamán nyújtottak. Továbbá szeretném megköszönni minden barátomnak, aki támogatott munkám során és ösztönzött céljaim elérésére. Hálámat nem lehet szavakba önteni.

Végül, de nem utolsó sorban, jelen dolgozatot **Gömöri Kamillának** és **Müller Vanessának** szeretném ajánlani, akik mindig segítettek és támogattak, nélkülük nem jöhetett volna létre ez a munka.



## KÖZLEMÉNYEK MELYEK A JELEN TANULMÁNYHOZ KAPCSOLÓDNAK

**I. Raffai, T.,** Burián, K., Janovák, L., Bogdanov, A., Hegemann, J.H., Endrész, V., Virok, D.P.: *Vaginal Gel Component Hydroxyethyl Cellulose Significantly Enhances the Infectivity of Chlamydia trachomatis Serovars D and E*. Antimicrob Agents Chemother. 63, e02034-18, /aac/63/1/AAC.02034-18.atom (2018). doi:[10.1128/AAC.02034-18](https://doi.org/10.1128/AAC.02034-18) **IF:4.715**

**II. Rédei, D., Kúsz, N., Raffai, T.,** Bogdanov, A., Burián, K., Csorba, A., Mándi, A., Kurtán, T., Vasas, A., Hohmann, J.: *14-Noreudesmanes and a phenylpropane heterodimer from sea buckthorn berry inhibit Herpes simplex type 2 virus replication*. Tetrahedron. 75, 1364–1370 (2019). doi:[10.1016/j.tet.2019.01.050](https://doi.org/10.1016/j.tet.2019.01.050) **IF:2.379**

**III. Virok, D.P., Raffai, T.,** Kókai, D., Paróczai, D., Bogdanov, A., Veres, G., Vécsei, L., Poliska, S., Tizslavicz, L., Somogyvári, F., Endrész, V., Burián, K.: *Indoleamine 2,3-Dioxygenase Activity in Chlamydia muridarum and Chlamydia pneumoniae Infected Mouse Lung Tissues*. Front. Cell. Infect. Microbiol. 9, 192 (2019). doi:[10.3389/fcimb.2019.00192](https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00192) **IF:3.520**

ΣIF:10.614

## KÖZLEMÉNYEK MELYEK NEM KÉPEZIK A JELEN TANULMÁNY RÉSZÉT

**I. Klement, E., Raffai, T.,** Medzihradsky, K.F.: *Immobilized metal affinity chromatography optimized for the analysis of extracellular phosphorylation*. Proteomics. 16, 1858–1862 (2016). doi:[10.1002/pmic.201500520](https://doi.org/10.1002/pmic.201500520) **IF:2.470**

**II. Csábi, J., Raffai, T.,** Hunyadi, A., Zádor, E.: *Poststerone increases muscle fibre size partly similar to its metabolically parent compound, 20-hydroxyecdysone*. Fitoterapia. 134, 459–464 (2019). doi:[10.1016/j.fitote.2019.03.017](https://doi.org/10.1016/j.fitote.2019.03.017) **IF:2.431**

**III. Vanić, Ž., Rukavina, Z., Manner, S., Fallarero, A., Uzelac, L., Kralj, M., Amidžić Klarić, D., Bogdanov, A., Raffai, T., Virok, D.P., Filipović-Grčić, J., Škalko-Basnet, N.: Azithromycin- liposomes as a novel approach for localized therapy of cervicovaginal bacterial infections. IJN. Volume 14, 5957–5976 (2019). doi:[10.2147/IJN.S211691](https://doi.org/10.2147/IJN.S211691) **IF:4.471****

ΣIF:9.282

## TÁRSSZERZŐI LEMONDÓ NYILATKOZAT

Alulírott, **Dr. Paróczai Dóra** és **Dr. Kókai Dávid** (felelős társszerzők) kijelentjük, hogy **Raffai Tímea** (pályázó) PhD értekezésének tézispontjaiban bemutatott - közösen publikált - tudományos eredmények elérésében a pályázónak meghatározó szerepe volt, ezért ezeket a téziseket más a PhD fokozat megszerzését célzó minősítési eljárásban nem használta fel, illetve nem kívánja felhasználni.

.....  
Dr. Paróczai Dóra  
2019. augusztus 22.

.....  
Dr. Kókai Dávid

A pályázó tézispontjaiban érintett, közösen publikált közlemények:

Virok, D.P., **Raffai, T.**, Kókai, D., Paróczai, D., Bogdanov, A., Veres, G., Vécsei, L., Poliska, S., Tizslavicz, L., Somogyvári, F., Endrész, V., Burián, K.: *Indoleamine 2,3-Dioxygenase Activity in Chlamydia muridarum and Chlamydia pneumoniae Infected Mouse Lung Tissues*. Front. Cell. Infect. Microbiol. 9, 192 (2019). doi:[10.3389/fcimb.2019.00192](https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00192)