

**Doktori (PhD) értekezés tézisei**

# **Egy gomba specifikus protein foszfatáz vizsgálata**

Tóthné Szabó Krisztina

Témavezető: Dr. Dombrádi Viktor Béla



**DEBRECENI EGYETEM**  
Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2020

## **Egy gomba specifikus protein foszfatáz vizsgálata**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében  
az Elméleti Orvostudományok tudományágban

Írta: Tóthné Szabó Krisztina okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány doktori iskolája  
(Jelátviteli folyamatok sejt- és molekuláris biológiája programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Dombrádi Viktor Béla

Az értekezés bírálói: Prof. Dr. Gácsér Attila, MTA doktora  
Dr. Szatmári István, PhD

A bírálóbizottság:  
elnök: Prof. Dr. Csernoch László, MTA doktora  
tagok: Prof. Dr. Gácsér Attila, MTA doktora  
Dr. Szatmári István, PhD  
Ifj. Prof. Dr. Gallyas Ferenc, MTA doktora  
Prof. Dr. Nagy Bálint, MTA doktora

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet  
„A” épület tanterme  
2020. szeptember 7, 13:00 óra

## Bevezetés

Az invazív candidiasis a *Candida* genusba tartozó gombák által okozott súlyos fertőzés. A betegek közül leggyakrabban izolált *Candida* faj a *Candida albicans*. Egy 2008 és 2011 között végzett tanulmány szerint 2329 klinikai mintából 885 (38 %) esetben izoláltak *C. albicans*-t, de emellett más *Candida* fajok - mint a *Candida glabrata* vagy a *Candida parapsilosis* - is kezdenek elterjedni a kórházi fertőzéseket okozó kórokozók körében. A *C. albicans* a normál humán mikrobiom tagja. Egészséges emberek 65 %-ában található meg ez az opportunistá patogén úgy, hogy nem okoz komoly tüneteket. A környezeti tényezők változásával viszont veszélyes patogén gombaként viselkedik. Ismeretes, hogy a legyengült immunrendszerű betegekben (AIDS, autoimmun betegség, immunszuppresszív kezelés) a candidiasis halálos kimenetelű lehet. Magas a fertőzés rizikófaktora a cukorbetegség, rákos betegek, terhes nők, valamint idős emberek között, továbbá szteroid és antibiotikum terápia használata esetén. Mivel a jelenleg használt gombaölő szerekkel szemben egyre gyakoribb a rezisztencia, szükségessé vált olyan új hatáspontú gyógyszerek és kombinált terápiák kifejlesztése, amelyekkel hatékonyan szállhatunk szembe a *C. albicans* fertőzésekkel. A manapság forgalmazott gyógyszerek jelentős része jelátviteli útvonalakat érint, ezért úgy gondoljuk, hogy a szignáltranszdukciós terápia hatékony lehet a *C. albicans* elleni küzdelemben is. Az egyik leggyakoribb jelátviteli szignál a fehérjék foszforiláltsági állapota, amit a protein foszforiláció és defoszforiláció viszonya határoz meg. Számos ismert gyógyszer célpontjai a foszforilációt végző protein kinázok, amelyek mind egy ősi családból származnak. Emellett ígéretes megközelítés lehet, hogy a defoszforilációt végző foszfatázok csoportjából választunk gyógyszer célpontot. A protein foszfatázok családja sokkal változatosabb, evolúciójuk szerteágazó, és több gombaszpecifikus képviselőjüket is ismerjük. Az egyik ilyen gomba specifikus Ser/Thr foszfatáz a protein foszfatáz Z1, amelyet elsőként a *Saccharomyces cerevisiae* modellszervezetben írtak le. A *C. albicans*-ban egyetlen protein foszfatáz Z gén található, amit *CaPPZ1*-nek nevezték el, és kimutatták, hogy számos fiziológiás folyamatban játszik szerepet. Azt javasoljuk, hogy a gén terméke, a CaPpz1 protein megfelelő antifungális gyógyszer-célpont lehet a következő megfontolások alapján: Ismeretes, hogy a CaPpz1 gomba specifikus foszfatáz szerepet játszik a fertőzőképesség kialakításában. A *CaPPZ1* gén delécioja nem pusztítja el a gombát, de lassítja annak kitapadását és az azt követő élesztő-hifa átalakulást. Tehát a foszfatáz gátlása képes

blokkolni az invazív hifa forma fejlődését, ami összefüggésben áll a virulenciával. Úgy tűnik, hogy a *C. albicans* képes kompenzálni a foszfatáz hiányát, így a foszfatáz gátlása csak viszonylag enyhe következményekkel járna, ezért úgy gondoljuk, hogy a jelentősebb hatás kiváltására szükség van egy másik jelátviteli útvonal megzavarására is. Miután korábban kimutatták a CaPpz1 szerepét az oxidatív stressz válaszban, azt javasoljuk, hogy a foszfatáz gátlását enyhe oxidatív kezeléssel kombinálva egy specifikus antifungális kezelést lehetne kifejleszteni.

A CaPpz1 fiziológiás gátlószere a CaCab3 fehérje, ami nagy mérete és többirányú funkciója miatt nem tekinthető optimális gyógyszer-alapanyagnak. Ismeretes azonban, hogy a fehérje konzervált C-terminális doménjében található két CaPpz1 specifikus szerkezeti elem (az L1-csavarulat, és a specifikus C-terminális hélix); valamint a foszfatáz egyedi N-terminális doménje szabályozó funkcióval rendelkezik. Tehát a CaPpz1 specifikus C- és N-terminális szerkezeti elemei lehetővé teszik kis molekulatömegű CaPpz1 specifikus inhibitorok tervezését.

A fenti érvek alapján indokolt a CaPpz1 foszfatáz működésének és szabályozásának további kutatása. Mivel a korábbi célzott vizsgálatok a klasszikus élesztő modellel, a *S. cerevisiae*-vel végzett kísérletek logikáját követték, elképzelhető, hogy a *C. albicans* fonalas gombának éppen a fertőzőképességgel kapcsolatos funkciói nem kerültek felszínre. Ezért munkám során hipotézismentes, globális proteomikai és transzkriptomikai megközelítéseket alkalmaztam a foszfatáz új célpontjainak megismerésére, valamint eddig még nem ismert funkcióinak felkutatására. Kiemelt témám volt a CaPPZ1 gén hiánya és az oxidatív stressz kombinációjának együttes vizsgálata.

## Célkitűzések

Fő célunk a gomba specifikus CaPpz1 foszfatáz új funkcióinak feltárása volt normál, valamint *tercier*-butil-hidroperoxid (tBOOH) kezeléssel kiváltott oxidatív stressz körülmények között. Ezt globális proteomikai és transzkriptomikai megközelítésben kívántuk vizsgálni. A kísérletekhez rendelkezésünkre állt a *cappz1* foszfatáz hiányos mutáns (KO) törzs, valamint a QMY23 kontroll (WT) törzs.

Először szeretnénk volna a mutáció hosszú távú hatását, vagyis a gomba adaptációs mechanizmusait megismerni. Ezt foszfoproteomikai és proteomikai vizsgálatokkal kívántuk megvalósítani, amit egy RT-qPCR alapú transzkriptomikai vizsgálattal kívántunk kiegészíteni. Az esetlegesen azonosított, eddig még le nem írt új fiziológiás funkció(k) relevanciáját kísérletesen is szeretnénk volna alátámasztani.

Másodszor meg kívántuk vizsgálni a vad és KO mutáns *C. albicans* törzsek reagálását egy gyors oxidatív stressz kezelésre. Olyan kísérleti rendszert kívántunk létrehozni, ami lehetőséget nyújt a foszfatáz hiányának, az oxidatív kezelésnek, valamint a kettő kombinációjának összehasonlító elemzésére. Ehhez be kellett állítanunk az optimális tenyésztési és kezelési körülményeket, amelyek már kimutatható hatással vannak a gombára, de nem okoznak drasztikus változást a sejtek növekedésében, életképességében, vitalitásában és morfológiájában. Mivel a QMY23 törzset eddig nem jellemezték ebből a szempontból, szeretnénk volna megismerni mind a két törzs fiziológiás viselkedését oxidatív stressz körülmények között. Az oxidatív stressz hatásosságát oxidatív enzimek aktivitásának és a sejtek glutation tartalmának mérésével kívántuk alátámasztani. A fiziológiás kísérletek beállítását és az optimalizálást követően két független módszerrel kívántuk a transzkriptomikai vizsgálatokat elvégezni. Előkísérletként egy DNS chip hibridizációs vizsgálatot terveztünk, amit egy új-generációs RNS szekvenáláson alapuló fő kísérlet követ. Az így kapott eredményeket RT-qPCR módszerrel kívántuk alátámasztani.

Mindezen vizsgálatoktól azt vártuk, hogy a CaPpz1 foszfatáz újabb funkcióit ismerhetjük fel. A globális vizsgálatok új adatokat szolgáltathatnak a foszfatáz hiánya és az oxidatív stressz közötti kölcsönhatásra. Abban reménykedtünk, hogy eredményeink hozzájárulhatnak egy specifikus CaPpz1 gátlás és egy enyhe oxidatív stressz kombinálásán alapuló új gombaellenes kezelés kidolgozásra.

# Anyagok és módszerek

## ***C. albicans* sejtek tenyésztése**

A kísérletek során a *cappz1* foszfatáz hiányos mutáns (KO) törzset, valamint a QMY23 kontroll (WT) törzset használtuk. A tenyésztés során a két nap alatt YPD táptalajon, 37 °C-on felnövesztett telepekből kis kultúrákat készítettünk. Az így felnőtt tenyészetekből friss nagy kultúrákat hoztunk létre, amiket azonos optikai denzitás értékre állítottunk be. A proteomikai vizsgálatokhoz a kultúrákat majdnem log fázis eléréséig tenyésztettük. A transzkriptomikai vizsgálatokhoz a kezelés 1 órát vett igénybe, a sejteket *t*BOOH-val kezeltük, melynek végkoncentrációja 0,4 mM volt.

## **Biofilm képződés vizsgálata**

Az *in vitro* biofilm képzést kétféle tápoldatban vizsgáltuk, egyrészt a szokásos hidrogén-karbonátmentes RPMI-1640-ben, másrészt pedig a szelektívebb Spider médiumban. Meghatároztuk a száraz biofilm tömeget, valamint a planktonikus/nem kötődött sejtek tömegét, továbbá végeztünk egy kristályibolya festés. A tenyészetekről mikroszkópos felvételeket is készítettünk egy Olympus BD40 fáziskontraszt mikroszkóp és a hozzá rögzített digitális kamera segítségével, 40x nagyításban.

## **Fiziológiás vizsgálatok**

A gombasejtek fiziológiás állapotát több módszerrel is vizsgáltuk. A *t*BOOH-val kezelt és kezeletlen KO és WT tenyészetekből a sejteket kiszélesztettük YPD táptalajra és másnap megvizsgáltuk a sejtek kolóniaformáló képességét. Az eredményeket CFU/ml-ben adtuk meg. A sejtek életképességét metilénkék festéssel vizsgáltuk meg és fáziskontraszt mikroszkóp (*Euromex Holland*) alatt tettük láthatóvá. A sejtek vitalitását a *FungaLight*<sup>TM</sup> CFDA, AM/Propidium Iodide Yeast Vitality Kít segítségével vizsgáltuk meg. A sejteket Leica SP8 konfokális mikroszkóp alatt vizsgáltuk. A mikroszkópos képek kiértékelését ImageJ szoftverrel végeztük. A sejtek morfológiáját *FungaLight*<sup>TM</sup> Kittel való festés után Novocyte 3000 áramlási citométerrel (*Acea Biosciences, Inc.*) vizsgáltuk.

## Enzimaktivitás mérések és glutation koncentrációk meghatározása

Az enzimaktivitás mérésekhez mechanikai roncsolással tártuk fel a *C. albicans* mintákat. A fehérjetartalmat Bradford-módszerrel határoztuk meg. A kataláz, szuperoxid dizmutáz, glutation reduktáz és peroxidáz enzimaktivitás méréseket fotometriás módszerekkel végeztük. A minták glutation tartalmának meghatározása során a sejteket 5 %-os szulfoszalicilsavban vettük fel. Az oxidált (GSSG) és redukált (GSH) glutation koncentrációkat glutation reduktáz-DTNB módszer segítségével mértük le.

## Kétdimenziós elektroforézis és tömegspektrometria

A proteomikai vizsgálatokhoz a KO és WT sejtekből fehérjét preparáltunk. A minták fehérjetartalmát Bradford-reagenssel ellenőriztük. A kapott mintákat Ready-Prep 2D CleanUp Kit (*Bio-Rad*) segítségével tisztítottuk, majd azonnal felhasználtuk a kétdimenziós (2D) elektroforézishez. 3 biológiai párhuzamost, vagyis 3 KO és 3 WT mintát vizsgáltunk. Az első dimenzió az izoelektromos fókuszálás volt, amihez IPG (pH 4-7) csíkokat használtunk. A második dimenziós elválasztást 12 %-os SDS-poliakrilamid gélekben elektroforézissel végeztük. A géleket először ProQ Diamond festékkel festettük, ezzel tettük láthatóvá a foszfoproteineket. A géleket ezt követően házilag készített RuBPS [Ruthenium(II) tris(bathophenanthroline disulfonate) tetrasodium salt] fluoreszcens festékkel is megfestettük, ami a teljes proteomot detektálja. A géleket Pharox FX Plus Molecular Imager készülékkel szkenneltük.

A gélképeket Delta2D v4.4 (*Decodon*) szoftverrel analizáltuk. A minták közötti különbségek tanulmányozása három lépésben történt: elsőként a ProQ Diamonddal festett WT és KO géleket analizáltuk, majd a RuBPS-sel festetteket, végezetül minden foltot átvetítettünk egy egyesített gélképre foltkivágás céljából. Analizálást követően a szoftver automatikusan kiszámolta a minták közötti általános normalizált foltterfogat intenzitás változás értékeit, illetve Student-féle t-tesztel megállapította a különbségek szignifikanciáját. Azokat a foltokat, amelyek a WT és KO csoportok között szignifikáns eltérést ( $p < 0,05$ ) mutattak a normalizált foltterfogatban, kivágtuk a kevert mintát tartalmazó gélekből és fehérje tartalmukat a kivágott gélben emésztettük tripszinnel. A gélből kidiffundált triptikus peptideket tartalmazó oldatot leszívtuk és beszárítottuk. A fehérje

azonosítást tömegspektrometriával végeztük. A peptideket Easy nLCII (*Burker*) nanoHPLC készülékkel választottuk el egymástól. A peptidelegyeket Zorbax 300SB-C18 sómentesítő oszlopra vittük fel, majd ezt követően Zorbax 300SB-C18 analitikai oszlopon választottuk el. Az analitikai oszlopról eluált peptideket 4000 QTREP (*ABSciex*) tömegspektrométerrel vizsgáltuk. Az MS/MS spektrumokat pozitív ion módban vettük fel és az információfüggő adatgyűjtő módszert (IDA) alkalmaztuk.

A fehérjék azonosítását a ProteinPilot 4.5 szoftver (*ABSciex*) segítségével végeztük a kapott MS/MS spektrumok alapján. Kérdéses esetekben a szekvenciákat az NCBI nem redundáns protein adatbázisában a blastp program segítségével ellenőriztük. Minden szekvencia annotálást megerősítettünk a CGD adatbázisban végzett kétlépéses független adatkereséssel.

## **RNS izolálás**

A *C. albicans* sejteket liofilizálást követően TriReagentsben szuszpendáltuk. Mechanikai feltárás után a mintákhoz kloroformot adtunk a fázisok elválasztása érdekében, majd izopropanolt az RNS kicsapása végett. Az RNS-t nukleázmentes vízben vettük fel.

## **RNS szekvenálás**

Az RNA-Seq könyvtárakat totál RNS-ből állítottuk elő a „TruSeq RNA Sample preparation Kit” (*Illumina*) protokollja alapján. A szekvenálás az *Illumina* NextSeq500 műszerrel történt. Mintánként hozzávetőlegesen 18-20 millió szekvenciárészletet kaptunk. Ezeket a read-eket ráillesztettük a referencia genomra (*C. albicans*\_SC5314/ Assembly22 genom verzió). A genom térképezéshez, valamint az A és B allélok RPKM (Reads Per Kilobase Million) értékeinek megadásához és a bam fájlok létrehozásához a Tophat és Cufflinks bioinformatikai szoftvereket használtuk. Az egymáshoz tartozó A és B allélra vonatkozó RPKM értékeket összevontuk és ezeket használtuk a későbbi („downstream”) analízishez, amelyet az StrandNGS szoftverrel végeztünk. Az adatokat a DESEQ1 algoritmussal normalizáltuk. Az RNS szekvenálás nyers adataiból normalizálást követően log<sub>2</sub>FC („fold change”) értékeket számoltunk. A szignifikancia megadásához az ANOVA tesztet alkalmaztuk, amelyet Tukey post hoc teszttel és Benjamini-Hochberg FDR (False Discovery Rate) teszttel kombináltunk. A hőképek (heat map) készítéséhez a Cluster v3.0 és a Java

TreeView v1.1.6r4 nyílt forráskódú applikációkat használtuk. A kapott adatokat GO term analízisnek vetettük alá, amely során külön vizsgáltuk a felül- és alulszabályozott géneket háromféle megközelítésben (funkció, folyamat, lokalizáció). Csak azokat a géndúsulásokat vettük értékelhetőnek, amelyek korrigált p értéke kisebb volt, mint 0,05. Az RNS szekvenálást az UD-GenoMed Medical Genomic Technologies Kft. végezte a Debreceni Egyetem Klinikai Központjában.

### **Reverz transzkripció és kvantitatív PCR (RT-qPCR)**

Minden esetben a teljes RNS preparátumokból cDNS-t írtunk át úgy, hogy az RNS mintákat először DNáz enzimmel kezeltük. A kvantitatív PCR során használt primereket a Primer3 v0.4.0 szoftverrel terveztük, és az Oligo Analyser v1.0.2 programmal ellenőriztük. A kvantitatív valós-idejű PCR-hez a 2x qPCRBIO SyGreen Mix Lo-ROX (*Nucleotest BIO*) Master mixet használtuk. A méréseket a Roche LightCycler® 480 II (*Roche*) műszerrel végeztük. Az adatokat az *ACT1* gén expressziójához viszonyítottuk. A gének relatív expresszióját a vizsgált mintákban a  $\Delta\Delta CP$  módszerrel határoztuk meg. A p értékeket Student- féle t-próbával, valamint ANOVA teszttel határoztuk meg.

## Eredmények és következtetések

### A CaPpz1 szerepe a proteom és a foszfoproteom vizsgálata alapján

A foszfoproteomika/proteomika metodikáját arra használtuk fel, hogy feltérképezzük a CaPpz1 hiányának hosszabb távú következményeit a *C. albicans*-ban. Ezek a vizsgálatok lehetővé tették, hogy olyan adaptációs mechanizmusokat tárjunk fel, amelyekkel az opportunistá patogén képes a foszfatáz hiányát kompenzálni. Összesen 25 fehérjét találtunk, aminek mennyisége és/vagy foszforiláltsági szintje megváltozott CaPpz1 hiányában. Ezeket a fehérjéket funkcionálisan 4 nagy csoportba sorolhatjuk: protein szintézis/degradáció, morfológiai változások, oxidatív stressz válasz, valamint metabolizmus.

A 25 azonosított fehérjéből 14 vesz részt a fehérje szintézis/degradáció folyamataiban. Ebből 9 közvetlenül részt vesz a translációban; ezek között van 1 translációs iniciációs faktor (Tif1), 3 translációs elongációs faktor (Efb1, Eft1 és Cef3) és 5 riboszómális fehérje komponens (Rpp0, Rps7A, Rpl9B, Rpl20B és Rps0A). További 3 chaperon fehérje (Ssa4, Tsa1 és Crp3) a szintetizálódó fehérjék feltekeredését biztosítja és 2 fehérje (Uba1 és Rad23) a protein degradációban vesz rész. A translációt érintő proteinek közül összesen 7 fehérje szintje csökkent, míg a proteolízist elősegítő Uba1 (ubikvitin aktiváló enzim) szintje növekedett CaPpz1 foszfatáz hiányában. Ez azt sugallja, hogy a foszfatáz nélkül a fehérje szintézis lelassul. Ezt a megfigyelést támasztja alá az a tény, hogy *S. cerevisiae*-ben az ScPpz1 szintén negatívan befolyásolja a translációt. A fehérjék foszforiláltsági szintje ezzel szemben sokkal változatosabb mintázatot mutatott a *CaPPZ1* gén deléciója nyomán. Az Eft2 (elongációs faktor), Rad23 (DNS repair protein) és az Rpp0 (riboszómális fehérje) foszforilációs szintje megnövekedett, míg a Rpl26 (riboszómális fehérje) és az Rps7A (riboszómális fehérje), a Tif1 (elongációs faktor) és az Uba1 (ubikvitin aktiváló enzim) fehérje foszforilációja lecsökkent. A foszforilációs szint csökkenése azzal magyarázható, hogy a CaPpz1 összefüggésben van más regulátorokkal, mint pl. a Sit4 foszfatáz, amellyel ellentétesen hat, illetve a MAP kinázzal, amivel összhangban működik. A Cef3 (elongációs faktor) fehérjét két foltban is azonosítottuk és miközben mindkét foltban csökkent fehérje mennyiséget detektáltunk, az egyik foltban csökkent a fehérje foszforilációja is. Tehát ebben az esetben a reguláció nem defoszforilációval történik.

Eredményeink alapján feltételezhetjük, hogy az Eft2 és Rpp0 szubsztrátjai lehetnek a CaPpz1-nek. A translációs elongációs faktor 2-nek a riboszóma transzlokációjában van szerepe a fehérje szintézis során. Az Rpp0 fehérjében számos kazein kináz 2 foszforilációs konszenzus szekvencia motívumot találtunk. Élesztő ortológjáról kimutatták, hogy kazein kinázzal szabályozható, azonban ez a szabályozás nem esszenciális a transláció során, inkább az ozmoregulációban van szerepe. Az 25 fehérjéből felépített hálózat is mutatta azon feltételezésünket, miszerint az Eft2 és a Rpp0 direkt célpontjai lehetnek a Ppz1 foszfatáznak. A hálózat központi magja a translációban szerepet játszó fehérjéket köti össze egymással több ponton és mivel az Eft2 elongációs faktor, míg az Rpp0 riboszómális fehérje, mindkettő fontos csomópontja a hálózatnak, kézenfekvő, hogy a Ppz1 ezen két fehérjén keresztül szabályozhatja a fehérje szintézist.

A CaPpz1 oxidatív stresszben való szerepét már korábban publikáltuk. Ezt alátámasztva sikerült 3 olyan oxidatív stresszel kapcsolatos fehérjét is kimutatnunk, amelyeknek a mennyisége vagy a foszforilációja változott: Ure2 (glutation peroxidáz), Dug1-szerű (Cys-Gly metallopeptidáz) és a Tsa1 (tioreodoxin peroxidáz). Eredményeink arra utalnak, hogy a foszfatáz hiánya befolyásolhatja a redukált és oxidált glutation arányát.

A CaPpz1 hiánya 5 metabolikus enzimet is befolyásolt. Az Idh1 (izocitrát dehidrogenáz) és a Tkl1 (transzketoláz) fehérje mennyisége megnövekedett a KO sejtekben. Az Aip1 (dehidrogenáz), Guk1 (guanilat kináz) és a Ham1 (inozin-trifoszfát pirofoszfatáz) fehérjék foszforilációja lecsökkent a mutáns sejtekben. Mint már korábban leírtam, ezeket a fehérje defoszforilációs hatásokat a foszfatáz hiányos törzsben a CaPpz1 és MAP-kináz útvonal közötti, valamint a CaPpz1 és a Sit4 foszfatázok közötti kölcsönhatásokkal értelmezhetjük.

Végül azonosítottunk 3 proteint, az Ade12 (adenilsuccinát szintáz), a Bmh1 (14-3-3 scaffold fehérje) és a Lia1-szerű (deoxihipuzin hidroxiláz) fehérjét, amelyek a morfológiai átalakulásban vesznek részt. Az Ade12 szintje megemelkedett CaPpz1 hiányában, míg a Bmh1 és Lia1-szerű fehérje szintje lecsökkent. Ezek az adatok jól korrelálnak egy korábban közölt biofilm vizsgálat során kapott eredményekkel, ui. az Ade12 felülszabályozott, míg az Bmh1 és a Lia1-szerű fehérje alulszabályozott a biofilm képzés során. Továbbá az általunk azonosított fehérjék közül 17-ről adatbázis kutatással azt találtuk, hogy szerepük lehet a biofilm képzés alatt.

Ezek az adatok arra sarkalltak bennünket, hogy kísérletesen megvizsgáljuk a *CaPPZ1* delécio hatását a biofilm képzésben. Azt tapasztaltuk, hogy a szelektív Spider médiumban a

KO mutáns törzs erősebb biofilmet képezett. Ez valószínűleg abból adódott, hogy a KO sejtek hifázó képessége alacsonyabb, nagyobb az élesztő sejtek aránya, ami kompaktabb struktúrát hozott létre. Tehát bizonyítottuk, hogy a CaPpz1 foszfatáznak szerepe van a biofilm képzésben. Ezen új funkció fiziológiai jelentőségének kivizsgálására további kísérletekre van szükség.

### **A CaPpz1 szerepe a transzkriptom analízis szerint**

Ebben a kísérletsorozatban egy rövid tBOOH kezelést alkalmazva vizsgáltuk a gomba gyors válaszát az oxidatív stressz hatásra. Több módszerrel (növekedés, CFU számlálás, mikroszkópia) is alátámasztottuk, hogy a kísérleti körülményeket megfelelően állítottuk be egy globális transzkriptomikai vizsgálathoz. Kimutattuk, hogy a szubletális koncentrációjú tBOOH-val végzett 1 órás kezelés kis mértékben indukálja a gomba hifa képződését, csökkenti a sejtek növekedését, de nem öli meg azokat, annak ellenére, hogy gátolja a proliferációjukat. A KO sejtek esetében a tBOOH kezelés fungicid hatása igen jelentős, ami alátámasztja a foszfatáz és az oxidatív kezelés közötti kölcsönhatásra vonatkozó elképzelésünket. Ezt a kölcsönhatást megerősítette az antioxidáns enzimek aktivitásának emelkedése, valamint a redukált és oxidált glutation koncentrációk eltolódása is. Biokémiai vizsgálataink arra utaltak, hogy a sejtek redoxi státuszát a foszfatáz hiánya és az oxidatív kezelés külön-külön is befolyásolja, de a két hatás egymást felerősíti, vagyis szinergizmus lép fel közöttük. Fontos megjegyezni azt, hogy a KO törzzsel kapott enzimaktivitás változások önmagukban is új eredménynek számítanak, mert rámutatnak arra, hogy a CaPpz1 hogyan befolyásolhatja a *C. albicans* oxidálószerekkel szembeni érzékenységét.

Egy DNS chip hibridizációs előkísérlet után RNS szekvenálással határoztuk meg a kezelt és kezeletlen WT és KO sejtek génexpresszióját. Az első eredmények azt mutatták, hogy a foszfatáz hiánya és az oxidatív stressz kezelés önmagában csak kismértékű transzkriptom változást okoz, ezzel szemben a kettő együttesen markánsan megváltoztatja a *Candida* génexpressziós profilját.

Az adatokat egy teljes körű gén ontológiai elemzésnek vetettük alá, hogy megtudjuk, melyek azok a funkció, lokalizáció vagy folyamat szempontjából összetartozó gének, amelyek érintettek a foszfatáz hiányában és az oxidatív stressz alatt. Az adatok elemzése alapján végül öt fő géncsoportot különítettünk el, amelyek a membrán transzport, sejtfelszín,

oxidáció-redukció, riboszómális fehérjék és RNS metabolizmus kategóriákkal álltak kapcsolatban. Az egyes csoportok szigorú ellenőrzése után hőtérképeket készítettünk, és a térképek, valamint az elérhető irodalmi adatok alapján kiválasztottunk 44 db gént, amelyeknek az expresszióját RT-qPCR módszerrel kívántuk megerősíteni.

A transzport folyamatok esetében bizonyítottuk az *ENA2* nátriumion transzporter gén megnövekedett expresszióját KO törzsben. Irodalmi adatok alapján ismert, hogy a KO törzs jól tolerálja a sókezelést. Ezzel a kísérlettel sikerült igazolnunk a foszfátáz sóháztartásban kifejtett egyik hatásmechanizmusát. Ezen kívül több olyan transzport folyamatban is kimutattunk a CaPpz1 szerepét, amit eddig még nem írtak le. A *PHO84* foszfát, a *GIT1* glicerofoszfo-inozitol és a *HGT1* glükóz transzporter gének expressziója egyaránt növekedett a KO sejtekben. A *PHO84* transzkripciós szabályozása azért érdekes, mert a Pho84-ről kimutatták, hogy a *TORC1* (Target of Rapamycin complex 1) potenciális regulátora, ami a sejtnövekedést szabályozza. A Git1 által felvett glicerofoszfo-inozitol a sejtekben inozitol és foszfát forrásként szolgál. A *HGT1*-ről kimutatták, hogy egy nagy affinitású glükóz transzporter, amelynek expressziója megnövekedett különböző gyógyszerek jelenlétében. Ebből arra lehet következtetni, hogy a CaPpz1 szerepet játszhat a gyógyszerrezisztencia kialakításában.

A CaPpz1 oxidatív stressz válaszban betöltött szerepét jelezték a biokémiai vizsgálatok, amelyek rávilágítottak arra, hogy a CaPpz1 képes a patogén gomba oxidatív állapotát befolyásolni az oxidoreduktáz enzimek aktivitásának megváltoztatásával. Transzkriptomikai vizsgálatunk szerint 3 oxidázt kódoló gén (*CFL2*, *FET31*, *SOD4*) expressziója növekedett meg szignifikánsan a KO törzsben, tehát ezeknek a géneknek a szabályozásában szerepe lehet a CaPpz1-nek. A *CFL2* (oxidoreduktáz) és a *FET31* (multiréz oxidáz) oxidázokat kódoló gének expressziójának változása arra enged következtetni, hogy a CaPpz1-nek szerepe lehet a vas transzportban, mivel ezeknek a géneknek a terméke vas reduktáz aktivitással rendelkezik. A *SOD4* által kódolt szuperoxid dizmutáz esetében láttuk a legmarkánsabb változásokat. Valószínűsíthető, hogy a *SOD4* megemelkedett szintje segíti a mutáns sejtek túlélését oxidatív stressz körülmények között. Ez összhangban van az enzimaktivitás mérésekkel, ui. a SOD enzim aktivitása megemelkedett a KO sejtekben, tehát elképzelhető, hogy a SOD enzim aktivitását a CaPpz1 már a transláció szintjén befolyásolhatja.

Tehát a foszfatáz hiánya befolyásolja a membrán transzportot és az oxidációs-redukciós folyamatokat, ami megmagyarázza a deléciós mutáns törzsre jellemző fenotípusokat.

Külön megvizsgáltuk a tBOOH kezelés hatását önmagában. Ehhez összehasonlítottuk a kezelt kontroll törzs génexpresszióját a kontroll törzsével (WTt vs. WT). Azt találtuk, hogy az enyhe oxidatív stressz transzkriptomikai hatása mérsékelt volt.

Az oxidatív stressz önmagában négy, az oxidáció-redukció folyamatában szerepet játszó gén expresszióját növelte meg. Ezek közül a *FET31* és a *SOD4* mRNS szintje a kezeletlen KO sejtekben is megemelkedett, ami arra utal, hogy az oxidatív stressz és a foszfatáz hiánya azonos célpontokra irányul. Ezzel összhangban áll, hogy a *CFL4* és a *SOD3* expressziója szintén megemelkedett az oxidatív kezelés hatására. Eredményeinkből levonható, hogy a vas transzport szabályozása közös pont lehet a foszfatáz hiány és az oxidatív stressz jelátviteli útvonalaiiban; valamint a SOD enzimek expressziójának emelkedése egy újabb mechanizmus, ami összeköti a foszfatáz hiányát az oxidatív stressz elleni védelemmel.

A transzport folyamatok közül csak a *GAP1* aminosav transzporter és a *CDR1* ABC transzporter gének expressziója emelkedett tBOOH kezelés hatására. Ez azt mutatja, hogy az oxidatív stressz megváltoztathatja azon transzport folyamatokat, amelyeknek a gomba védelmi mechanizmusaiban van szerepe.

Összesen 4 sejtfelszínnel kapcsolatos gént sikerült azonosítanunk, amelyek expressziója lecsökkent oxidatív kezelés hatására: *CHT3* kitináz, *FGR41* adhézíós fehérje, *PLB1* foszfolipáz B és a *CDC19* piruvát kináz. Ezen gének termékei virulencia faktorként és sejtfelszíni markerként viselkedhetnek.

Az oxidatív kezelés önmagában kis mértékben csökkentette 5 citoszólikus riboszómális fehérje kódoló gén expresszióját. Ezek között található 3 citoszólikus riboszómális alegység (*RPL29*, *RPS3* és *RPS8A*) valamint a riboszómához kötődő *RPP1B* savi riboszómális fehérje génje és a *CAM1* translációs elongációs faktor génje. Ebből arra következtethetünk, hogy az oxidatív stressz hatására lecsökkent fehérje szintézis lehet az oka a sejtek alacsony kolóniaformáló képességének.

Végül új megfigyelésünk az, hogy az RNS metabolizmusban szerepet játszó gének expressziója megnövekedett oxidatív stressz hatására. 4 gén estében bizonyítottuk az eredeti megfigyelést, ezek közül a *BUD22* és az *NSA2* az rRNS érésben játszanak szerepet;

valamint az *SPB4* RNS helikáz és a *C3\_02750W* ribonukleáz. Ez egy eddig még nem vizsgált oxidatív stressz válasz mechanizmusra hívta fel a figyelmünket.

A foszfatáz hiánya és a *tBOOH* kezelés együttes hatásának vizsgálata céljából összehasonlítottuk a kezelt és kezeletlen KO törzset (KOt vs. KO). Azt találtuk, hogy a két kondíció együttesen nagymértékű és markáns változásokat okozott. Azok a gének, amelyek önmagában is hatott a *tBOOH* kezelés, még nagyobb mértékben reagáltak, és ezen kívül megjelentek olyan gének is, amelyek eddig nem mutattak jelentős transzkripció változást.

A KOt sejtekben 5 transzport folyamatokban érintett gén (*HGT1*, *GAP1*, *CDR1*, *TRK1* és *NAG3*) expressziója növekedett meg. A *HGT1* génre önmagában hatott a foszfatáz hiánya, de a kezeléssel kombinálva ez a hatás felerősödött. A *GAP1* és *CDR1* gének expressziója *tBOOH* hatására már a WT törzsben is megnövekedett, de a mutáns genetikai háttérben ez a változás még jelentősebbé vált. A *TRK1* ( $K^+$  transzporter) és a *NAG3* (MFS transzporter) gének expressziója csak KOt törzsben emelkedett meg jelentős mértékben. A Trk1 és Ppz1 közötti kölcsönhatást már leírták, de hogy ez a transzkripció szintjén is megvalósulhat, azt csak az oxidatív stressz körülményei között lehetett kimutatni. A Nag3 multidrog transzporter funkciója hasonlít a Hgt1 transzporterhez. Tehát a KO törzsben két pumpa is biztosíthatja az oxidálószer eltávolítását és a túlélést. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a CaPpz1-nek az ABC transzporterek módosítása révén szerepe lehet a gyógyszerrezisztencia kialakításában.

Az oxidációs-redukciós folyamatokban szerepet játszó gének közül a KO sejtekben a *SOD3*, *SOD4*, *CFL4* és az *AOX2* érzékenyen reagált *tBOOH* kezelésre. Ezek közül a *SOD3*, *SOD4* és *CFL4* a WT törzsben is megnövekedett a *tBOOH* kezelés hatására, azonban ez a sejtválasz jelentősen felerősödött a *PPZ1* hiányos törzsben. Az Aox2 (alternatív oxidáz) emelkedett expresszióját  $H_2O_2$ -vel és menadianonnal kiváltott oxidatív stressz hatására már korábban publikálták. Mindezen eredmények bizonyítják az Aox2 fontosságát oxidatív stressz alatt, ami arra utal, hogy a fehérje védőfunkciót lát el.

A sejtfelszíni fehérjék alulszabályozását oxidatív stressz alatt már korábban leírtuk. Azt tapasztaltuk, hogy ezt a hatást a *CaPPZ1* gén deléciója felerősítette. Az *IFF1* (szekretált fehérje), a *PGK1* (foszfoglicerát kináz) és a *GPM1* (foszfoglicerát mutáz) gének mRNS szintje csak a kezelt KO sejtekben csökkent jelentős mértékben. A *PGK1*, *GPM1* és a fentebb említett *CDC19* gén termékét „feketemunkás” fehérjeként tartjuk számon, ugyanis

egyrészt metabolikus enzimként működnek a citoszólban, másrészt a sejtek felszínén a szimbionta folyamatokban vesznek részt. Az utóbbi ismerete fontos lehet egy antifungális terápia kifejlesztése szempontjából is.

Nagymértékű génexpressziós változást tapasztaltunk a kezelt KO törzsben a riboszómális gének expressziójában. Kétféle mintázatot kaptunk, - ui. a citoszólikus riboszómális fehérjéket kódoló gének expressziója lecsökkent, míg a mitokondriális riboszómális fehérjéket kódoló gének expressziója megnövekedett - ezért kettéválasztottuk ezeket a fehérjéket. A citoszólikus riboszómális fehérjéket kódoló gének közül 1 riboszómális nagy alegység (*RPL29*), 2 riboszómális kis alegység (*RPS3*, *RPS8A*), az *RPP1B* savi riboszómális fehérje és a *CAM1* elongációs faktor esetében a foszfatáz hiánya felerősítette a *tBOOH* kezelés hatását; a KOt törzsben az *EFT2* (transzlációs elongációs faktor) expressziója szignifikánsan lecsökkent. A proteomikai vizsgálataink során azt találtuk, hogy az *Eft2* szubsztrátja lehet a *CaPpz1*-nek, mivel foszforiláltsági szintje megemelkedett a KO törzsben, de a foszfatáz hiányában génexpressziós szinten nem detektáltunk szignifikáns változást. Valószínű, hogy a *CaPpz1* elsősorban poszttranszlációs szinten szabályozza az *Eft2* fehérjét, de mivel az oxidatív kezelés lecsökkentette az *EFT2* gén expresszióját KO törzsben, lehetséges, hogy az oxidatív stressz alatt transzkripciószabályozás is megvalósulhat.

A mitokondriális riboszómával kapcsolatos gének expressziós szintje egységesen megemelkedett a foszfatáz hiányos törzsben. Az *MRPL3* (riboszómális nagy alegység) és *C5\_0453W* (riboszómális kis alegység) esetében bizonyítottuk az mRNS szint növekedését a *tBOOH* kezelt KO törzsben. A citoszólikus és mitokondriális riboszóma ellentétes szabályozását a fagocitózis által kiváltott stressz során már korábban felismerték azzal a magyarázattal, hogy a mitokondriális riboszóma a gomba túlélése szempontjából esszenciális funkciókat lát el.

Végül az RNS metabolizmus génjei egységes módon kisebb vagy nagyobb mértékben indukálódtak *tBOOH* kezelés hatására a KO törzsben. 4 gén (*BUD22*, *NSA2*, *C3\_02750W* és *SPB4*) expressziója már a WT törzsben megnövekedett *tBOOH* kezelés hatására, és ez a növekedés felerősödött a foszfatáz hiányában. Emellett a *DIM1* rRNS dimetiláz és a pre-RNS érés szabályozásában szerepet játszó *ENP1* expressziója növekedett meg a KOt sejtekben. Mivel a *BUD22*, *NSA2*, *DIM1* és *ENP1* gének a pre-rRNS érésben vesznek részt,

lehetséges, hogy a már legyártott preriboszómák gyorsabban össze tudnak szerelődni a rövidtávú stressz alatt, ezáltal segítve a gomba védekezését az oxidatív stressz ellen. Megfigyeléseink hozzájárulhatnak egy új gombaellenes terápiás eljárás kidolgozásához, ui. fiziológiás kísérleteink szerint a foszfátáz hiányos sejtek oxidatív kezelése nagymértékben visszavetette azok növekedését és proliferációját. Továbbá a foszfátáz deléciója meggátolta az oxidatív stressz által indukált hifanövekedést, ami a virulencia faktorok szintjének csökkenésével együtt csökkentheti a patogén gomba fertőzőképességét. Eközben a gombasejtek életképesek maradtak. Ez egy fontos szempont, hiszen a *C. albicans* a normál mikrobiom tagja, ezért teljes eltávolítása a szervezetből nem kívánatos, mert utat nyithat az esetleg sokkal veszélyesebb gombafajok elszaporodása előtt. Tehát úgy gondoljuk, hogy a gomba Ppz1 specifikus gátlása és egy enyhe oxidatív stressz együttes alkalmazása kihasználható a felszíni gombafertőzések kombinált kezelésére. A disszertációmban bemutatott eredmények megteremtették az általunk javasolt eljárás elvi alapjait, és utat nyitottak a téma kidolgozásához szükséges további kutatások megvalósítása előtt.

## Összefoglalás

A *C. albicans* egy opportunista humán patogén gomba, amely tartalmaz egy gomba specifikus Ser/Thr protein foszfatázt, a CaPpz1-t. A foszfatáznak szerepe van a kation homeosztázis fenntartásában, a sejtfal bioszintézisben, morfológiai változásokban, oxidatív stressz válaszban és a gomba virulenciájában. Munkám során omikai eszközökkel kutattam a CaPpz1 újabb funkcióit normál és oxidatív stressz körülmények között.

Elsőként a *ppz1* deléciós mutáns (KO) törzs adaptációs mechanizmusait vizsgáltuk proteomikai módszerekkel, összevetve a WT törzzsel. 2D elektroforézis és a gélek festése után, összesen 25 fehérjét sikerült azonosítanunk tömegspektrometriával, amelyek mennyisége és/vagy foszforilációs szintje jelentősen megváltozott a KO sejtekben. A fehérjék funkcionális analízisét követően megerősítettük a CaPpz1 szerepét a fehérje szintézisben, a morfológiai átalakulásban és az oxidatív stressz válaszban. Emellett felismertük és független kísérletekkel igazoltuk a CaPpz1 új funkcióját a biofilm képzésben. Ezt követően transzkriptomikai módszerekkel vizsgáltuk a KO és WT törzsek *terc*-butil-hidroperoxid (tBOOH) által kiváltott rövid oxidatív stresszre adott válaszát. Kimutattuk, hogy a tBOOH kezelés csökkentette a sejtek növekedését és gátolta a proliferációt, de nem befolyásolta lényegesen a sejtek életképességét és vitalitását. Az oxidatív stressz és a foszfatáz deléció érzékenyen érintette az antioxidáns enzimek aktivitását és a glutation oxidációs állapotát. A génexpressziós változások detektálására az RNS szekvenálást alkalmaztunk. Azt találtuk, hogy a CaPpz1 hiánya és az oxidatív stressz önmagában csak kis vagy közepes hatással rendelkezik, de a kettő együttesen markáns transzkripciós változásokat okoz, ami erős pozitív interakcióra utal. A gének ontológiai analízisét követően 44 gént választottunk ki további RT-qPCR vizsgálatra. Bizonyítottuk a CaPpz1 szerepét a membrán transzportban és az oxidációs-redukációs folyamatban. Igazoltuk, hogy oxidatív stressz alatt csökken a sejt felszíni fehérjéket és a citoszolikus riboszóma fehérjéket kódoló gének expressziója, míg a transzportban, oxidáció-redukcióban és az RNS metabolizmusban részt vevő gének expressziója megemelkedik. Ezek a változások a KO sejtekben felerősödtek, tehát a CaPpz1 megvédi a gombát az oxidatív stresszel szemben. Alapvető eredményeink felvetik annak a lehetőségét, hogy a CaPpz1 foszfatáz specifikus gátlása megfelelő oxidatív kezeléssel kombinálva, egy új *Candida*-ellenes terápia alapjául szolgálhat.

# Publikációs jegyzék



**DEBRECENI  
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM  
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400  
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/136/2020.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Tóthné Szabó Krisztina  
Neptun kód: GXG2A2  
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

## A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Szabó, K.**, Jakab, Á., Pólska, S., Petrényi, K., Kovács, K., Issa, L. H. B., Emri, T., Pócsi, I., Dombrádi, V.: Deletion of the fungus specific protein phosphatase Z1 exaggerates the oxidative stress response in *Candida albicans*. *BMC Genomics*. 20, 1-17, 2019.  
IF: 3.501 (2018)
2. Márkus, B., **Szabó, K.**, Pfliegler, V. P., Petrényi, K., Boros, E., Pócsi, I., Tózsér, J., Csősz, É., Dombrádi, V.: Proteomic analysis of protein phosphatase Z1 from *Candida albicans*. *PLoS One*. 12 (8), 1-21, 2017.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0183176>  
IF: 2.766

## További közlemények

3. **Szabó, K.**, Kónya, Z., Erdődi, F., Farkas, I., Dombrádi, V.: Dissection of the regulatory role for the N-terminal domain in *Candida albicans* protein phosphatase Z1. *PLoS One*. 14 (2), 1-27, 2019.  
IF: 2.776 (2018)

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 9,043**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 6,267**

A DEENK a Jelölt által az IDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományos metrika ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2020.04.29.

