

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

A protein foszfatáz Z szerepe és regulációja *Candida albicans*-ban

Petrényi Katalin

Témavezető: Dr. Dombrádi Viktor



**DEBRECENI EGYETEM
MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA
Debrecen, 2017**

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke	4
2. Bevezetés.....	5
3. Irodalmi áttekintés	7
3.1 A <i>Candida albicans</i> jellemzése	7
3.2 Poszttranszlációs módosítások	7
3.2.1 Protein foszforiláció és defoszforiláció	8
3.3 A protein foszfatázok csoportosítása	9
3.4 A protein foszfatáz Z egy gombaspecifikus protein foszfatáz	10
3.4.1 A protein foszfatáz Z funkciói.....	11
3.5 A <i>C. albicans</i>-ban található CaPpz1 funkciója	12
3.6 A CaPpz1 fehérje szerkezete és regulációs lehetőségei	14
3.6 A Ppz regulációja Hal3 fehérjével.....	17
3.7 Hal3 homológok szerepe a CoA bioszintézisében	20
4. Célkitűzések	23
5. Anyagok és módszerek.....	24
5.1 Anyagok.....	24
5.1.1 Vegyszerek	24
5.1.2 Táptalajok.....	24
5.1.3 Oldatok, pufferek.....	25
5.2 Módszerek	26
5.2.1 <i>E.coli</i> sejtek tenyésztése és vizsgálata.....	26
5.2.2 <i>Candida albicans</i> sejtek tenyésztése és vizsgálata	27
5.2.2.1 Hifa növekedés vizsgálata	28
5.2.2.2 Morfológiai elemzés time-lapse videomikroszkópiával.....	28
5.2.3 <i>S. cerevisiae</i> sejtek tenyésztése és vizsgálata	28
5.2.3.1 Növekedési teszt.....	29
5.2.3.2 Tetrád analízis	30
5.2.4 DNS klónozása és vizsgálata.....	30
5.2.4.1 Genomi DNS preparálás.....	30
5.2.4.2 Plazmid DNS preparálás.....	31
5.2.4.3 PCR	33
5.2.4.4 Restrikciós hasítás	34
5.2.4.5 Agaróz gélelektroforézis	35
5.2.4.6 DNS klónozás.....	35
5.2.5 Fehérjék izolálása és vizsgálata.....	36
5.2.5.1 Rekombináns fehérjék termeltetése.....	36

5.2.5.2 GST-címkével ellátott fehérjék tisztítása affinitás kromatográfiával	37
5.2.5.3 6xHis címkével ellátott fehérje tisztítása affinitás kromatográfiával	39
5.2.5.4 Western blot	40
5.2.6 Fehérje-fehérje kölcsönhatások kimutatása.....	40
5.2.6.1 „Pull down” baktériumban expresszált tisztított rekombináns fehérjékkel	40
5.2.6.2 „Pull down” élesztőben expresszált rekombináns fehérjékkel	41
5.2.7 Protein foszfatáz aktivitás mérés	42
6. Eredmények	43
6.1 A CaPPZ1 gén szerepe a hifaképzésben	43
6.2 Protein foszfatáz Z inhibitorok vizsgálata C. albicans-ban	48
6.2.1 Lehetséges protein foszfatáz Z inhibitorok azonosítása a C. albicans genomban.....	48
6.2.2 CaHal3 és CaCab3 fehérjék CoA bioszintézisben betöltött szerepének vizsgálata.....	49
6.2.3 A C. albicans Hal3 ortológ fehérjeinek szerepe a CaPpz1 regulációjában	50
6.2.3.1 A Hal3 ortológok és a Ppz1 fehérje közötti interakció kimutatása pull down módszerrel	51
6.2.3.2 Hal3 ortológok hatása a CaPpz1 in vitro foszfatáz aktivitására	55
6.2.3.3 In vivo foszfatáz gátló funkciók vizsgálata S. cerevisiae modellben.....	58
7. Megbeszélés.....	66
7.1 A CaPpz1 morfológiai szerepe	66
7.2 A CaPpz1 regulációja Hal3 ortológokkal.....	67
8. Összefoglalás	72
9. Summary	73
10. Tárgyszavak.....	74
11. Köszönetnyilvánítás.....	75
12. Irodalom jegyzék.....	76

1. Rövidítések jegyzéke

AMPER: ammónium-perszulfát

BSA: szarvasmarha szérum albumin

β -ME: β -merkaptoetanol

CaPpz1-Cter: CaPpz1 C-terminális domén

DMSO: dimetil-szulfoxid

DTT: ditiotritol

EDTA: etilén-diamin-tetraecetsav

FBS: főtális marha szérum

GST: glutation-S-transzferáz

HA: human influenza hemagglutinin

IPTG: izopropil- β -D-tiogalaktopiranozid

LiAc: lítium-acetát

OD: optikai denzitás

PBS: foszfátpufferes sóoldat

PEG: polietilén-glikol

PMSF: fenil-metil-szulfonil-fluorid

PPZ: protein foszfátáz Z

rpm: percenkénti fordulatszám

ScPpz1-Cter: ScPpz1 C-terminális domén

SDS: nátrium-dodecil-szulfát

St: standard

TCA: triklór-ecetsav

TEMED: tetrametil-etiléndiamin

Megjegyzés

A fehérjék, gének, mRNS-ek és mutánsok rövidítését a *Saccharomyces cerevisiae* nomenklatura szerint végeztük (protein foszfátáz példáján: *CaPPZ1*-gén vagy mRNS; CaPpz1-fehérje, és *cappz1*-géndeláció). Kétbetűs rövidítéssel jeleztük, hogy mely fajból származik az adott fehérje vagy gén, mint például: *Candida albicans* PPZ1 gén, *CaPPZ1*. A mutáns törzsek megnevezésében csak akkor használtuk a faj nevére utaló előtagot, ha az a szakirodalomban így szerepel.

2. Bevezetés

A *Candida albicans* egy opportunistá patogén gomba, amely fiziológiás körülmények között is megtalálható az egészséges emberi szervezetben, de a meggyengült immunrendszerű betegekben túlszaporodva mycosist okoz. A klinikákon *C. albicans* okozza a leggyakoribb gombafertőzést. Egy amerikai vizsgálat kimutatta, hogy a *C. albicans* által okozott szisztémás candidiasis az immunhiányos felnőttekben 49%-os, gyerekekben 29%-os halálozási arányt okoz. Ez a mortalitás a legmagasabb a többi *Candida* fajhoz viszonyítva (Pappas és mtsai., 2003). A szisztémás candidiasis kezelésére a fluconazol és/vagy az amphotericin B kezelés az orvosi gyakorlat, de a terápia gyakran sikertelen, mivel az antifungális szerekkel szembeni rezisztencia egyre gyakoribb (Sanglard, 2002). Ezért szükséges új potenciális terápiás célpontok keresése. Többek között a jelátviteli terápia lehet a megoldás a szisztémás candidiasis kezelésére, amely során egy jelátviteli út befolyásolásával megváltoztatható a sejtek növekedése, osztódása vagy morfológiai változása. A candidiasis kezelés során nem szükségszerűen a gomba teljes eliminálása a cél, hiszen fiziológiás körülmények között is megtalálható a szervezetben, és a gomba teljes kipusztításának hatására más patogén gombák túlszaporodása lehet a válaszreakció. Ezért indokolt a *C. albicans* azon jelátviteli útvonalainak kutatása, amelyek befolyásolásával megváltoztatható a sejtek növekedése, osztódása vagy morfológiai változása.

Ismeretes, hogy a fehérje foszforiláció és defoszforiláció olyan reverzibilis poszttranszlációs módosítások, amelyek fontos jelátviteli útvonalakat szabályoznak az eukarióta sejtekben. A fehérjék foszforilációját a protein kinázok katalizálják, míg a fehérjék defoszforilációjáért a protein foszfatazok a felelősek. A protein foszfataz Z (PPZ) egy gombaszpecifikus új típusú szerin/treonin protein foszfataz. A PPZ-t először *Saccharomyces cerevisiae*-ben írták le (Posas és mtsai., 1992), majd több gombafajban is kimutatták és jellemezték. Mivel a PPZ fontos élettani folyamatokban vesz részt és csak a gombában található meg potenciális célpontja lehet a jelátviteli terápiának.

A *C. albicans*-ban egyetlen protein foszfataz Z-t kódoló gén található, a *CaPPZ1*. A *CaPPZ1* gént és termékét, a CaPpz1 fehérjét munkacsoportunk írta le és jellemezte (Kovács és mtsai., 2010; Ádám és mtsai., 2012). A CaPpz1 fehérje két fő részből áll: egy C-terminális globuláris szerkezetű katalitikus doménből, amely erősen konzerválódott szakasz, nagy hasonlóságot mutat a többi gombafajban leírt Ppz fehérjékkel, valamint a protein foszfataz 1 katalitikus alegységével (PP1c), illetve egy N-terminális rendezetlen szerkezetű doménből,

amelynek mérete és szekvenciája erősen eltérő a különböző Ppz fehérjékben. Kimutattuk, hogy a CaPpz1 fehérje szerepet játszik a sóháztartásban, membránpotenciál kialakításban, a sejtfall integritásban, és az oxidatív stresszválaszban (Ádám és mtsai., 2012; Leiter és mtsai., 2012). Ezeket a funkciókat már *S. cerevisiae*-ben is vizsgálták, és elmondható, hogy a CaPpz1 az *S. cerevisiae* Ppz1 fehérjéhez hasonló szerepet tölt be (Ádám és mtsai., 2012). Ezek mellett a *C. albicans*-ban rendkívül fontos a virulencia és a hifaképzés vizsgálata. Kimutatták, hogy a *cappz1* deléción csökkent virulenciát okoz (Noble és mtsai., 2010, Ádám és mtsai., 2012). Mivel a *C. albicans* fertőzést befolyásoló egyik tényező az élesztő-hifa morfológiai átmenet (Pukkila-Worley és mtsai., 2009; Dalle és mtsai., 2010) munkánk során megvizsgáltuk, hogy a CaPpz1 fehérje hiánya hogyan befolyásolja a gomba morfológiáját.

Az ismert PPZ enzimek mindegyikében megtalálható egy konzervált C-terminális katalitikus domén és egy változatos, rendezetlen szerkezetű N-terminális domén. A CaPpz1 katalitikus doménjének homológ modellezéssel készített (Ádám és mtsai., 2012) és röntgendiffrakcióval meghatározott szerkezetét is ismerjük (Chen és mtsai., 2016). Chen és munkatársai megvizsgálták a CaPpz1 és a jól ismert PP1c szerkezete közötti azonosságokat és bizonyították, hogy vannak olyan fehérje motívumok, amelyek a CaPpz1-re specifikusak. A PP1 fehérjében megtalálható inhibitor-kötő motívumok részben konzerválódtak a CaPpz1 fehérjében, viszont kísérletes mérések során azt tapasztaltuk, hogy ezen inhibitorok nem képesek az enzim foszfatáz aktivitását regulálni. A megváltozott szabályozás oka lehet az, hogy a kötő motívumok kritikus aminosav maradékai nem konzerválódtak, illetve az, hogy a CaPpz1-specifikus szerkezeti elemek, valamint az N-terminális domén gátolják a tipikus PP1c-vel kölcsönható fehérjék kötődését (Chen és mtsai., 2016). Tehát a szerkezeti vizsgálatok kizárták azt a lehetőséget, hogy a PP1c regulátorai fontos szerepet játszanak a CaPpz1 szabályozásában. Ezért fontos a PPZ-specifikus szabályozó fehérjék kutatása a *C. albicans*-ban.

A Ppz speciális regulátora a Hal3 fehérje, amelyet először *S. cerevisiae*-ben írtak le (de Nadal és mtsai., 1998). Bebizonyították, hogy a Hal3 és ortológja, a Vhs3 fehérje képesek gátolni a Ppz foszfatáz aktivitását (Ruiz és mtsai., 2004). Később kiderült, hogy a Hal3 két homológjával (Vhs3 és Cab3) kiegészülve a sarjadzó élesztőben heterotrimert képez és részt vesz a CoA bioszintézisében (Ruiz és mtsai., 2009). Bioinformatikai keresésünk eredményeként megtaláltuk a Hal3 és Cab3 ortológjait *C. albicans*-ban.

Munkám során a *C. albicans*-ban található gombaspecifikus protein foszfatáz Z morfológiára gyakorolt hatását és a Hal3, valamint Cab3 ortológok általi regulációját vizsgáltam.

3. Irodalmi áttekintés

3.1 A *Candida albicans* jellemzése

A *Candida albicans* a *Saccharomycetaceae* családba tartozó opportunistá patogén gombafaj. Mint opportunistá patogén fiziológiás körülmények között is megtalálható az emberi nyálkahártyán, bőrön, tüdőben és bélrendszerben. Immunhiányos állapotban túlszaporodása következtében candidiasist okoz. Elsősorban a bőrön és a nyálkahártyán elszaporodva okoznak megbetegedést, de immunhiányos állapotokban szisztémás candidiasis is kialakulhat. Amerikai klinikákon a gombafertőzésekért legtöbb esetben a *C. albicans* felelős. A Semmelweis Egyetemen végzett kutatás alapján tudjuk a 2010 és 2014 között vizsgált candidiasis mintákból legtöbbször izolált faj a *C. albicans* (63%) volt (Pongrácz és mtsai., 2015). Amerikai kutatások szerint, a *C. albicans* által okozott szisztémás candidiasis immunhiányos felnőttek esetében 49%-os, gyerekeknél pedig 29%-os halálozási arányt mutat; ez a mortalitás a legnagyobb a többi *Candida* fajhoz viszonyítva (Pappas és mtsai., 2003). Magyarországi adatok kissé eltérnek az amerikai adatoktól, hiszen a vizsgált candidiasis betegek több mint fele 30 napos mortalitást mutatott, és ezen megbetegedések feléért (50,7%-ért) a *C. albicans* volt a felelős (Pongrácz és mtsai., 2015). A magyar lakosság 16%-a érintett gombás fertőzésekben, ebből évente 33 ezer életveszélyes megbetegedést regisztrálnak (Sinkó és mtsai., 2015). A szisztémás candidiasis kezelésére az orvosi gyakorlatban fluconazolt és/vagy amphotericin B-t használnak azonban az antifungális szerekkel szembeni rezisztencia egyre gyakoribb (Sanglard, 2002).

A *C. albicans* morfológiai változásai, a hifa forma és a pseudohifa forma megjelenése, fontosak a szisztémás mikózis kialakulásában (Pukkila-Worley és mtsai., 2009; Dalle és mtsai., 2010). A hifa forma jelentős szerepe miatt különösen fontos a morfológiai változások megfigyelése és az élesztő-hifa átmenet kialakulását befolyásoló tényezők feltérképezése.

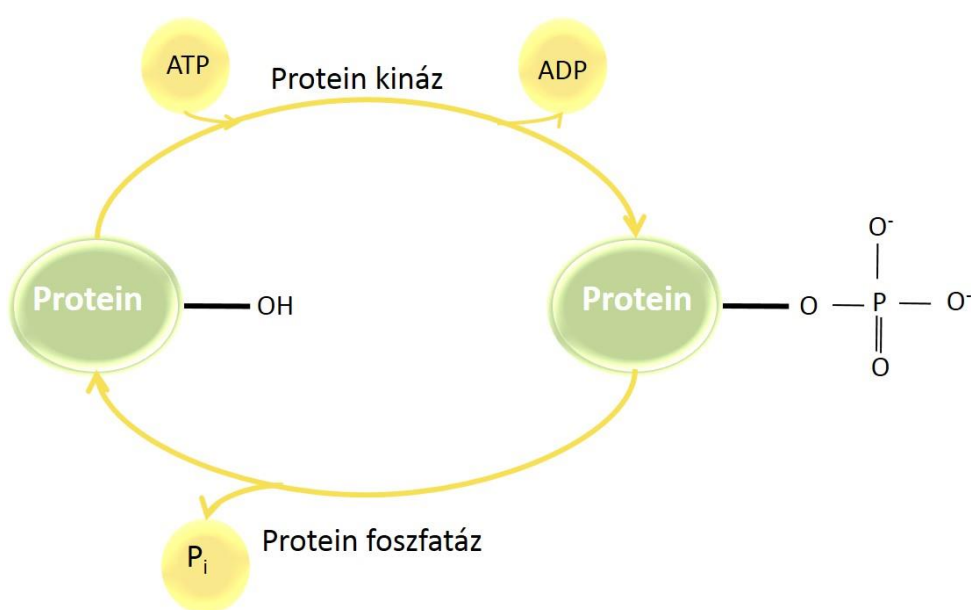
3.2 Poszttranszlációs módosítások

Egy sejt működése nagyban függ a fehérjék expressziós mintázatától, de az expresszáldott fehérjék állapotától is, így az expresszáldott fehérjék poszttranszlációs módosításai nagyban befolyásolják a fehérje sejten belüli funkcióját, illetve sejten belüli elhelyezkedését. A poszttranszlációs módosításokat aszerint csoportosítják, hogy a fehérjén bekövetkező változás irreverzibilis vagy reverzibilis. Az irreverzibilis módosítások közé tartoznak például a protelitikus hasítások, vagy a preniláció. A reverzibilis módosítások közé tartozik például a foszforiláció, az acetiláció, ubikvitináció, vagy az ADP-ribóziláció.

Munkánk során figyelmünk egy olyan reverzibilis poszttranszlációs módosításra irányult, amely az eukarióta sejtek egyik fő regulációs mechanizmusa: a fehérjék foszforilációja és defoszforilációja.

3.2.1 Protein foszforiláció és defoszforiláció

A fehérjék foszforilációs/defoszforilációs poszttranszlációs módosítását két különböző enzimescsoport végzi. A fehérjék foszforilációját a kinázok, míg a fehérjék defoszforilációját a protein foszfatázok katalizálják. Az 1. ábrán látható, hogy a fehérjében a Ser, Thr és Tyr aminosav maradékok -OH csoportjához protein kináz enzimek kötik a foszfátcsoporthoz egy energiaigényes folyamat során, majd a foszfátcsoporthoz hidrolitikus lehasítását a protein foszfatázok végzik.



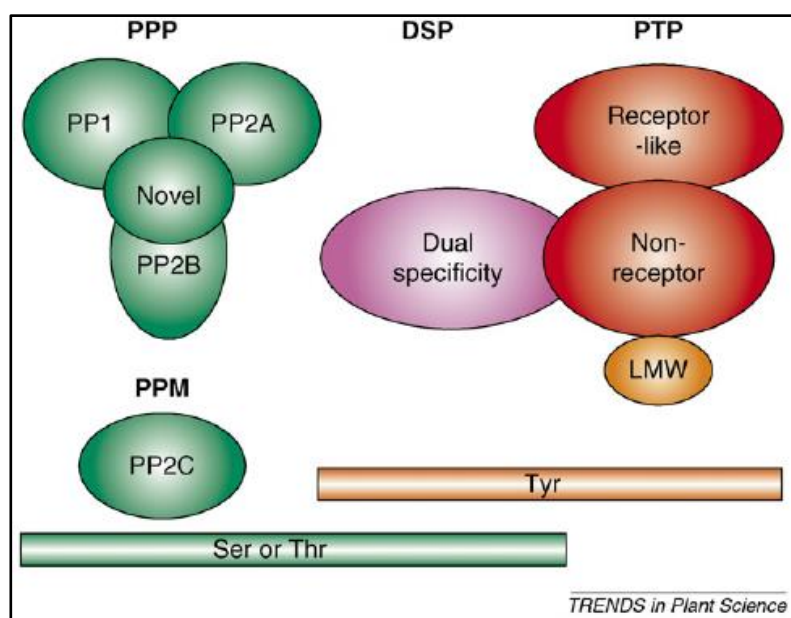
1. ábra. Fehérje foszforiláció és defoszforiláció

A fehérjékhez kapcsolódó foszfátcsoporthoz megváltoztatja a fehérje töltését és konformációját, így a fehérje funkciója is megváltozhat. A protein kinázok és foszfatázok aktivitásuk révén aktiválhatnak és inaktiválhatnak enzimeket, receptorokat, jelátviteli útvonalakat, így működésük a sejt minden életfolyamatára kihat, ilyen például a CDC25, amely a CDK1 kináz defoszforilálásával aktiválja az enzimet és indukálja a mitózist (Timofeev és mtsai., 2010), vagy az inzulin receptor, amely inzulin kötődése után autofoszforilációval

aktiválódik (Gammeltoft és mtsai., 1986). Tehát a fehérje foszforiláció és defoszforiláció az eukarióta sejtek jelátviteli útvonalainak meghatározó szabályozója.

3.3 A protein foszfatázok csoportosítása

A protein foszfatázok szubsztrát specifitása szerint három nagy csoportba sorolhatók: szerin/treonin-specifikusak, tirozin-specifikusak, vagy kettős specifitással rendelkeznek (2. ábra). A foszforiláció és defoszforiláció az előbb említetteken kívül más aminosavakon is lejátszódhat, mint például a hisztidin, aszparaginsav, de munkám során az alábbi csoportosítást veszem alapul.



2. ábra. Protein foszfatázok csoportosítása szubsztrátspecifitásuk szerint (Farkas és mtsai., 2007)

A tirozin-specifikus protein foszfatázok két nagy csoportját különböztetjük meg: a receptor típusú tirozin foszfatázok és a nem-receptor típusú tirozin foszfatázok, vagyis nem transzmembrán típusú protein tirozin foszfatázok csoportját (Fischer és mtsai., 1991; Tonks, 2013).

A kettős specifitású protein foszfatázok a szerin/treonin, illetve tirozin oldalláncon lévő foszfátcsoportot is képesek lehasítani (Guan és mtsai., 1991). A tirozin foszfatázokat négy csoportba sorolják szekvencia homológia alapján, ahol a cisztein-alapú tirozin foszfatáz csoportba tartoznak a receptor típusú, a nem-receptor típusú tirozin foszfatázok és a kettős

specifitású foszfatázok is (Patterson és mtsai., 2009). A tirozin-specifikus protein foszfatázokhoz sorolhatók a kis molekulatömegű foszfatázok (LMW) is. Egy szarvasmarha májból izolált kis molekulatömegű protein foszfatáz aminosav szekvenciáját és szerkezetét határozták meg először (Camici és mtsai., 1989; Su és mtsai., 1994).

A szerin/treonin specifikus protein foszfatázokat két fő csoportba sorolják: foszfoprotein foszfatázok (PPP) és fémion-függő protein foszfatázok (PPM). A PPM foszfatázok magnézium-függő foszfatázok, fő képviselői a PP2C protein foszfatázok (Cohen, 1997). A PPP családba tartoznak a PP1, PP2A, PP2B foszfatázok és ezen foszfatázok között átmenetet mutató új típusú protein foszfatázok. A PPP enzimek két fémiont tartalmaznak az aktív centrumukban, és számos regulátor alegységgel alkotnak holoenzim formákat.

Az új típusú protein foszfatázokhoz tartozik a számos élőlényben megtalálható PP4, PP5 és a PP6. A PP6 homológja *S. cerevisiae*-ben a Sit4 foszfatáz, amely szerepet játszik a sejtciklus során a G1/S átmenetben. Az új típusú protein foszfatázok között találunk olyanokat is, amelyeket kizárólag gombákban fordulnak elő, mint a protein foszfatáz Q és a protein foszfatáz Z (Cohen, 1997; Dombrádi és mtsai., 2002). A továbbiakban kutatásunk célpontját, a protein foszfatáz Z irodalmi hátterét ismertetem.

3.4 A protein foszfatáz Z egy gombaspecifikus protein foszfatáz

A gombaspecifikus protein foszfatáz Z egy új típusú szerin/treonin-specifikus protein foszfatáz, amelyet elsőként a *S. cerevisiae* fajban írtak le. *S. cerevisiae*-ben két PPZ gén található: az *ScPPZ1* és *ScPPZ2* (Da Cruz e Silva és mtsai., 1991; Posas és mtsai., 1992; Posas és mtsai., 1993). *S. cerevisiae*-n kívül már számos gombafajban leírták és jellemezték a protein foszfatáz Z-t, ezek a következők: *Neurospora crassa* Pzl1 (Szöör és mtsai., 1998), *Schizosaccharomyces pombe* Phz1 (Balcells és mtsai., 1997), *Debaryomyces hansenii* DhPpz1 (Minhas és mtsai., 2012), *Aspergillus fumigatus* PhzA, *Aspergillus nidulans* PpzA (Leiter és mtsai., 2012) és *Candida albicans* CaPpz1 (Kovács és mtsai., 2010; Ádám és mtsai., 2012). Az eddig leírt Ppz fehérjékre jellemző, hogy C-terminális katalitikus doménjük nagymértékben konzerválódott, aminosav-sorrendjük jelentős azonosságot mutat. Az alábbiakban ismertetem a különböző gombafajokban található PPZ funkciójának feltárására irányuló kutatások eredményeit.

3.4.1 A protein foszfatáz Z funkciói

S. cerevisiae-ben található Ppz fehérjék közül az ScPpz1 a domináns izoforma: az ScPpz2 fehérje fokozza az ScPpz1 hiányában megfigyelt fenotípust, de deléciójának egyedül nincs jelentős hatása. A továbbiakban ezért az ScPpz1 fehérje sejtben betöltött szerepéről ismert irodalmi adatokat fogom összegezni. Az *ScPPZ1* gén deléciója NaCl és LiCl toleranciát okoz, tehát az ScPpz1 fehérje részt vesz a nátrium és lítium effluxban úgy, hogy az *ENA1* génen keresztül fejt ki hatását (Posas és mtsai., 1995). Az *ScPPZ1* deléció hatására tapasztalható kálium-érzékenység a Trk1,2 transzportereken keresztül történő káliumtranszport változásával magyarázható (Yenush és mtsai., 2002). Ezzel összhangban a ScPpz1 szerepet játszik az ozmotikus stabilitás kialakításában (Hughes és mtsai., 1993). A foszfatáz gén hiányában a plazmamembrán depolarizációja csökkenti a toxikus kationok felvételét, így az *ppz1* deléciós mutánsok toleránsak olyan toxikus kationokkal szemben, mint például Hygromycin B (Yenush és mtsai., 2002). A mutáns *ppz1* sejtek sejtfolkárosító anyagokkal szembeni hiperszenzitivitása arra utal, hogy a gén deléciójának hatására megváltozik a sejtfa integritása (Posas és mtsai., 1993; Yenush és mtsai., 2002). Az ScPpz1 szerepet játszik az oxidatív stressz válaszában, ugyanis az *ppz1* mutáció érzékennyé tette a sejteket olyan oxidálószerekkel szemben, mint a tercier-butyl-hidroperoxid (tBOOH) és a diamid (Leiter és mtsai., 2012).

Az ScPpz1 fehérje szerepet játszik a G1/S átmenetben, ahol a Sit4 foszfatázzal ellentétes funkciót tölt be: az ScPpz1 overexpressziója csökkent növekedést okoz, mert a G1 fázisban tartja a sejteket (Clotet és mtsai., 1999). Az *ppz1/2* dupla mutáns sejtek hőérzékenyek, akárcsak az *slt2* mitogén aktivált protein kináz deléciós mutáns. Az *ppz1/2* mutáció tovább súlyosbítja az *slt2* mutáció okozta lítikus fenotípust (Lee és mtsai., 1993), illetve az ScPpz1 fehérje overexpressziója csökkenti a lítikus fenotípust az *slt2* mutánsokban (de Nadal és mtsai., 1998). Az Slt2 túltermeltetése *ppz1* deléciós törzsekben az Slt2 megnövekedett foszforiláltsági szintjéhez vezet. Az *slt2* és *ppz1,2* deléciók hatására a sejtekben megnövekedett a turgor nyomás (Merchan és mtsai., 2004). Tehát az ScPpz1 a genetikai kölcsönhatásban áll a protein kináz C/mitogén aktivált protein kináz útvonallal. Továbbá kimutatták, hogy az ScPpz1 szerepet játszik a transzlációs elongációs faktor 1 β Ser-86 defoszforilálásában, azaz szabályozza a fehérjeszintézist is (de Nadal és mtsai., 2001).

1997-ben Balcells és munkatársai írták le és jellemezték az *S. pombe* Pzh1 fehérjét (Balcells és mtsai., 1997). A *pzh1* deléciós mutáns nátriumion és lítiumion toleranciát, illetve káliumionnal szemben érzékenységet mutatott, tehát az ScPpz1-hez hasonlóan szerepet játszik a sóháztartásban (Balcells és mtsai., 1997). Ez azzal magyarázható, hogy a H⁺-ATPáz

szabályozásában (Balcells és mtsai., 1998) és a Trk1 által mediált nátriumion influxban (Balcells és mtsai., 1999) játszik szerepet. A Pzh1 fehérje overexpressziója az *ppz1* deléciós mutánsokban helyreállította a koffeinnel szembeni érzékenységet, de a *pzh1* deléciós *S. pombe* sejtek nem voltak érzékenyek koffeinnel szemben (Balcells és mtsai., 1997).

Neurospora crassa-ban egy protein foszfatáz Z gén van, a *PZL1* (Szöör és mtsai., 1998). A Pzl1 fehérjéről tudjuk, hogy *ppz1* deléciós mutáns *S. cerevisiae* sejtekben helyreállította a koffein és lítium ion iránti megváltozott érzékenységet, tehát komplementálta az ScPpz1 hiányát. A Pzl1 fehérje az ScPpz1-hez hasonlóan csökkentette a lítikus fenotípust az *slt2* hiánymutáns *S. cerevisiae* sejtekben. Az *S. pombe pzh1* sejtekben overexpresszált Pzl1 fehérje részben helyreállította a sótoleranciát ezekben a sejtekben (Vissi és mtsai., 2001).

Minhas és munkatársai 2012-ben publikálták a *D. hansenii* DhPpz1 fehérje funkcióját. A DhPPZ1 deléciója toleránssá teszi a *D. hansenii* sejteket toxikus kationokkal és lítiumionnal szemben, így az ScPpz1-hez hasonlóan szerepet játszik a sótoleranciában és a membránpotenciál kialakításban, azonban kiderült, hogy más útvonalon, a *DhNHA1* transzporterén keresztül hat. A *dhppz1* deléció csökkent növekedést okoz, amely eltér az ScPpz1 deléciójának hatásától (Minhas és mtsai., 2012).

Az *A. fumigatus* PhzA és az *A. nidulans* PpzA fehérjék tulajdonságairól elsőként Leiter és munkatársai publikáltak (Leiter és mtsai., 2012). Azt találták, hogy mindkét fehérje overexpressziója részben helyreállította az *ppz1* és *pzh1* hiánymutánsok fenotípusát. Mind a PhzA, mind pedig a PpzA helyreállította az *ppz1* deléciós törzsben a lítiumionnal, nátriumionnal és koffeinnel szembeni toleranciát, illetve mindkét fehérje expressziója megszüntette az *slt2* mutáns sejtekben a lítikus fenotípust. *S. pombe pzh1* deléciós mutánsban expresszált PzhA és PpzA részben helyreállította a káliumionnal, nátriumionnal és a koffeinnel szemben mutatott toleranciát. Kiderült az is hogy a PpzA fehérje szerepet játszik az oxidatív stressz válaszban, hiszen a *ppza* deléciós törzs lassú növekedést mutat oxidatív stresszt okozó ágensek jelenlétében (Leiter és mtsai., 2012). Ezzel összhangban később kimutatták, hogy az *A. fumigatus* PhzA fehérje is szerepet játszik az oxidatív stressz válaszban (Muszkieta és mtsai., 2014).

3.5 A *C. albicans*-ban található CaPpz1 funkciója

Candida albicans-ban egyetlen PPZ gén található, a *CaPPZ1*, amely jelentős variabilitást mutat: négy allélvariánst írtak le, amelyek között a különbségeket inzerciók/deléciók és aminosavcserék okozzák (Kovács és mtsai., 2010). Vizsgálataink során a

CaPPZ1-3 allélvariánssal dolgoztunk. *In vitro* foszfatáz aktivitás vizsgálatok szerint a rekombináns CaPpz1 fehérje képes volt defoszforilálni a p-nitrofenil-foszfát szubsztrátot (Ádám és mtsai., 2012).

A CaPpz1 overexpressziója *S. cerevisiae* *ppz1* mutáns sejtekben helyreállította a koffein érzékenységet, részben hatott a lítiumion toleranciára, de nem volt hatása a NaCl okozta sóstresszre. Az *slt2* mutánsban a CaPpz1 overexpressziója megszüntette a lítikus fenotípust, a sejtfal károsító koffein és Hygromycin B jelenlétében is életképesek voltak a sejtek. A CaPpz1 fehérje overexpressziója *S. pombe* *pzh1* deléciós mutánsban részben helyreállította a lítiumion, nátriumion, káliumion és koffein szenzitivitást is. A CaPpz1 fehérje mind az *S. cerevisiae*, mind pedig az *S. pombe* sejtekben egy kivétellel (nátriumion tolerancia) helyreállította az *ppz1* illetve *pzh1* mutánsokban tapasztalható fenotípusokat, tehát a CaPpz1 csaknem azonos funkciót látott el, mint az autentikus foszfatázok (Ádám és mtsai., 2012).

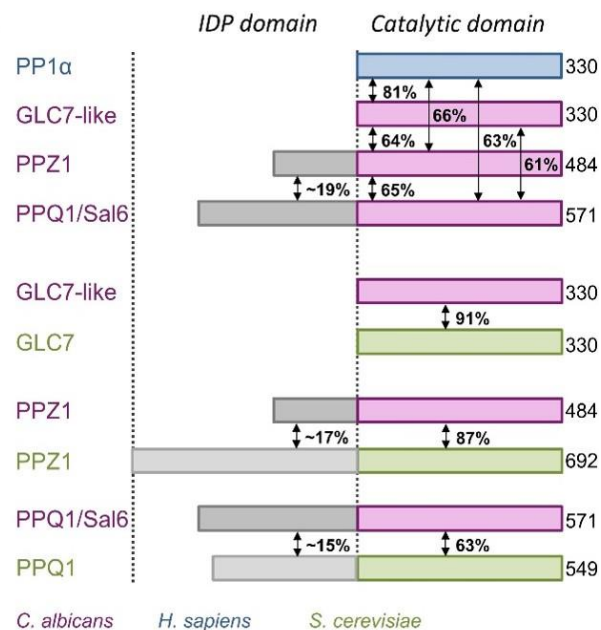
Egy korábbi tanulmányból ismert volt, hogy a *C. albicans* protein foszfatáz Z mindkét alléljának deléciója nem okoz letalitást (Hanaoka és mtsai., 2008). Ezért munkacsoportunk a CaPpz1 sejtben betöltött szerepének további vizsgálata céljából kiütötte a *CaPPZ1* gént (Ádám és mtsai., 2012). A homozigóta *cappz1* deléciós mutáns toleráns volt toxikus kationokkal szemben (Hygromycin B, congo red), érzékeny volt sejtfalkárosító szerekkel szemben (koffein, Calcoflour white). Továbbá a deléciós mutáns toleráns volt lítiumionnal szemben, és érzékeny volt káliumion jelenlétében, viszont nátriumion okozta stressz hatására nem volt jelentős különbség a kontroll és a mutáns sejtek növekedése között. A *cappz1* mutánssal végzett kísérletek azt mutatták, hogy a CaPpz1 funkcióját tekintve nagyon hasonló az ScPpz1 fehérjéhez, kisebb különbség mutatkozott a sóháztartásban szerepet játszó *ENA1* gén szabályozásában (Ádám és mtsai., 2012). Az eredményeket összefoglalva azt mondhatjuk, hogy a *cappz1* mutánssal végzett fenotípusos vizsgálatok szerint a *CaPPZ1* gén szerepet játszik a sejtfal integritásban, a kation homeosztázisban, a membránpotenciál kialakításában (Ádám és mtsai., 2012). További vizsgálatok igazolták, hogy az oxidatív stressz válaszban is jelentős szerepet tölt be a CaPpz1 fehérje, hiszen a *cappz1* deléciós mutáns csökkent növekedést mutatott az anyai törzshöz képest különböző oxidatív stressz ágensek jelenlétében (Leiter és mtsai., 2012).

Az előbbieken ismertetett vizsgálatok feltárták az *S. cerevisiae* ScPpz1 és a *C. albicans*-ban található CaPpz1 fehérjék közötti funkcionális hasonlóságokat. A *C. albicans* modell organizmussal azonban olyan vizsgálatokra is lehetőség volt, amelyekre a *S. cerevisiae* gomba nem volt alkalmas. Ilyen a CaPpz1 virulenciában és a hifaképzésben betöltött szerepének vizsgálata. Előkísérletekből és egy széles körű szűrővizsgálatból tudjuk, hogy a

CaPpz1 szerepet játszik a gomba virulenciában (Ádám és mtsai., 2012; Noble és mtsai., 2010). A fonalas gombára jellemző az élesztő-hifa átmenet, azaz a hifa forma kialakulásának jellemzésével pedig a CaPpz1 fehérje morfológiában betöltött szerepét jelen dolgozatban ismertetem.

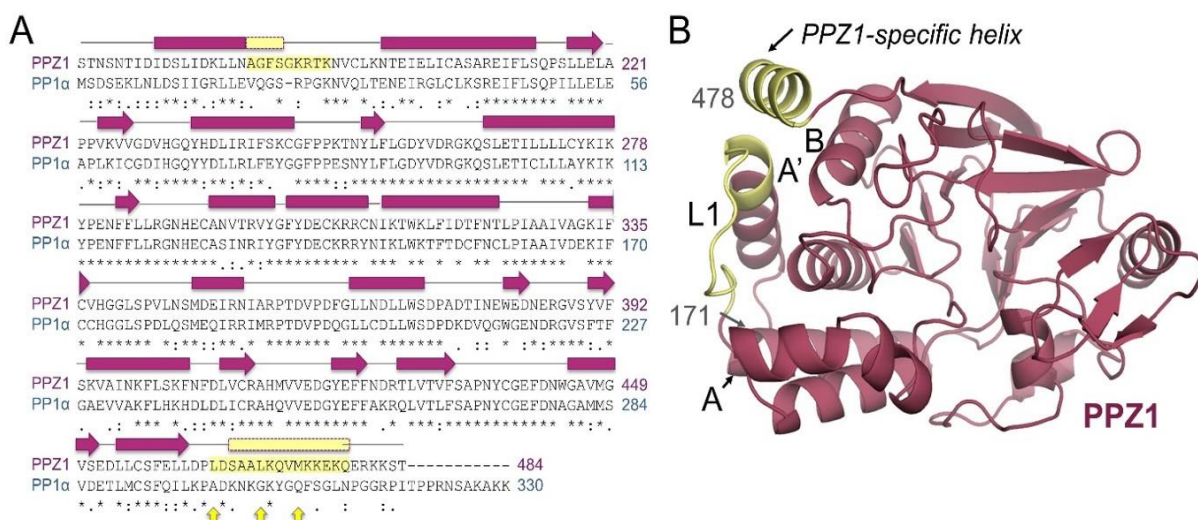
3.6 A CaPpz1 fehérje szerkezete és regulációs lehetőségei

A CaPpz1 fehérje szerkezetéről és foszfatáz aktivitásáról az első információkat 2012-ben publikálták Ádám és munkatársai. Ebben a közleményben homológ modellezéssel jósolták meg a CaPpz1 katalitikus doménjének 3D szerkezetét. A homológ modell elkészítésében a nyúl vázizom protein foszfatáz 1 katalitikus alegység (PP1c) atomi koordinátáit használták fel. A Chen és munkatársai által 2016-ban közölt eredmények ennél alaposabb betekintést adnak a CaPpz1 fehérje szerkezetébe és regulációjába, hiszen a munkacsoport meghatározta a CaPpz1 C-terminális domén röntgendiffrakción alapuló 3D szerkezetét. A 3. ábrán a *S. cerevisiae*-ben (zöld színnel) és a *C. albicans*-ban (lila színnel) PP1-szerű gomba fehérjék (Glc7 és Glc7-szerű), valamint a gombaspecifikus Ppz1 és Ppq1 fehérjék aminosav sorrendjének és a humán PP1c fehérje szekvenciájának (kék színnel) összehasonlítása látható. Szembetűnő a *C. albicans* enzimek (köztük a CaPpz1) katalitikus doménjeinek a humán PP1c-vel való nagymértékű azonossága, valamint a katalitikus domének konzerválódása a két gombafajban. Ezzel szemben a rendezetlen szerkezetű N-terminális domének egymáshoz képest kevesebb mint 20%-ban hasonlítanak (Chen és mtsai., 2016).



3. ábra. *C. albicans* PP1-szerű fehérjék szekvenciájának összehasonlítása *S. cerevisiae* és humán protein foszfatázokkal (Chen és mtsai., 2016). Az ábra felső részén a kék színnel jelölt *Homo sapiens* PP1α (protein foszfatáz 1 α izoformája) katalitikus alegység aminosav sorrendjének összehasonlítása látható a *C. albicans* PP1 szerű fehérjékkel: GLC7-like, PPZ1 és PPQ1 (a C-terminális katalitikus domének lila, a rendezetlen szerkezetű N-terminális szürke színűek). Az alsó részen található a *C. albicans* PP1-szerű fehérjéinek összehasonlítása a *S. cerevisiae* azonos PP1-szerű fehérjéivel: GLC7, PPZ, és PPQ1 (az utóbbi C-terminális katalitikus domének zöld színűek). Az adott fehérjék közötti szekvenciaazonosság mértékét a nyilak melletti %-os érték mutatja.

A 4.A ábra a CaPpz1 fehérje szekvenciáját és másodlagos szerkezetét hasonlítja össze a humán PP1c fehérjével. Lila szín jelöli a PP1c alegységével megegyező szerkezeti elemeket, amelyek a két fehérje nagyfokú hasonlóságára utalnak. A sárga szín az N- és C terminális végeken található, PPZ-re specifikus szakaszokat mutatja, ezeken a legjelentősebbek a térszerkezeti különbségek. A 4.B ábrán a domén harmadlagos szerkezetét reprezentáló modell látható, amely szerint a CaPpz1 felépítése lényegében követi a PP1c szerkezetét, kivéve a PPZ1-specifikus C-terminális hélixet és az N-terminális L1 kanyarulatot.



4. ábra. A CaPpz1 szerkezete (Chen és mtsai., 2016). 4.A ábra Humán PP1 (kék színnel) és *C. albicans* CaPpz1 (lila színnel) fehérjék aminosav szekvenciájának összehasonlítása. A téglalapok az α -héliceket, a nyilak a β -redőket, a vonalak pedig az összekötő loop-okat jelölik. Sárga színnel a CaPpz1 fehérjére specifikus loopot és hélixet alkotó aminosavakat jelölték. A sárga nyilak a CaPpz1-re specifikus hélixben lévő hidrofób aminosavakat mutatják. 4.B ábrán a CaPpz1 térszerkezete látható. Lila színnel jelölték a PP1-gyel azonos szerkezeti részeket, míg sárgával a kifejezetten CaPpz1 fehérjére specifikus loopot és α -hélixet.

A Brown Egyetemen (PR, USA) dolgozó munkacsoporttal együttműködésben a CaPpz1 szabályozásának lehetőségeit is vizsgáltuk fehérje kölcsönhatások kimutatásával és *in vitro* foszfatáz aktivitásmérés felhasználásával. Azt tapasztaltuk, hogy az ismert PP1c regulátor fehérjék nagy része nem kötődött a CaPpz1 fehérjéhez. A kisméretű microcisztin-LR képes volt gátolni a teljes hosszúságú CaPpz1 fehérjét és a C-terminális katalitikus domént tartalmazó CaPpz1-Cter csonkolt enzimformát is. Ezzel szemben a nagyméretű inhibitor-2 fehérjének nem volt hatása a teljes hosszúságú CaPpz1 fehérjére, a katalitikus domént viszont a PP1c-hez hasonlóan gátolta. Ebből arra következtettünk, hogy a teljes hosszúságú foszfatázban található N-terminális domén elfedheti az inhibitor-2 kötőhelyét, így védi az enzimet a gátló hatás ellen. A mérősorozatból arra a következtetésre jutottunk, hogy a klasszikus PP1c gátlószerek nagy része hatástalan a CaPpz1 szabályozásában. Az eltérő regulációt okozhatják a PP1-től eltérő szerkezeti elemek, a CaPpz1-re specifikus α -hélix és loop, illetve a CaPpz1 N-terminális doménje, amely a kötőhelyek eltakarásával védheti a katalitikus domént (Chen és mtsai., 2016).

3.7 A Ppz regulációja Hal3 fehérjével

De Nadal és munkatársai 1998-ban írták le először a Hal3 fehérjét, mint endogén Ppz regulátort. A *S. cerevisiae*-ben található Hal3 fehérjéről (továbbiakban ScHal3) tudjuk, hogy az ScPpz1 katalitikus doménjéhez kötődik, és foszfatáz aktivitását gátolja (de Nadal és mtsai., 1998). Az ScHal3 és az ScPpz1 fehérjék 1:1 molarányban kötődnek egymáshoz (Abrie és mtsai., 2015). Az ScHal3 fehérjét három doménre lehet bontani: N-terminális domén (NtD), PPCDC domén (PD domén), és C-terminális domén (CtD). A Ppz1fehérjéhez való kötődésben és a foszfatáz gátlásában a PD domén játszik kulcsszerepet (Abrie és mtsai., 2012).

Az ScHal3 fehérje overexpresszálása *schal3* deléciós mutánsokban és *ScHAL3* gént tartalmazó vad típusú törzsben egyaránt LiCl-dal és NaCl-dal szembeni toleranciát eredményezett (Ferrando és mtsai., 1995). Az ScHal3 fehérje túltermeltetése megnövekedett sejtosztódást okozott *sit4* mutáns sejtekben (Di Como és mtsai., 1995), *slt2* mutáns sejtekben pedig fokozta a lítikus fenotípust (de Nadal és mtsai., 1998). Tehát az ScHal3 fehérje overexpressziója és az ScPpz1 hiánya azonos fenotípust eredményez.

Ismeretes, hogy *S. cerevisiae*-ben három Hal3 paralóg van: ScHal3, ScVhs3 és ScCab3. A ScVhs3 az ScHal3-mal 49%-os szekvencia azonosságot mutat, funkcióját tekintve is hasonló az ScHal3 fehérjéhez, hiszen kötődik az ScPpz1 fehérjéhez, és foszfatáz aktivitását is gátolja (Ruiz és mtsai., 2004). Ez az eredmény összhangban van azzal, hogy a Vhs3 a Hal3-ból keletkezett a gomba genom duplikációja során. A harmadik Hal3 homológ, az ScCab3 eltér a többi fehérjétől azzal, hogy csak kis mértékben, de képes kötődni az ScPpz1 fehérjéhez, a foszfatáz aktivitását viszont nem tudja gátolni (Ruiz és mtsai., 2009).

S. cerevisiae-n kívül eddig *Schizosaccharomyces pombe*-ban vizsgáltuk a Hal3 ortológokat. *S. pombe*-ben csak egy Hal3 ortológ található, az SpHal3, amelynek különleges moduláris szerkezete van. A fehérje N-terminális része nagy hasonlóságot mutat az ScHal3 fehérjével, ezzel szemben a fehérje C-terminális része nagyon hasonlít a timidilát szintáz enzimhez. Érdekes módon a teljes SpHal3 fehérjének nincs Ppz foszfatázgátló hatása, csak a külön termeltetett N-terminális doménnek. Mivel a fehérje sejten belül proteolízissel nem processzálódik, nem szabadulhat fel belőle funkcióképes protein foszfatáz inhibitor (Molero és mtsai., 2013).

ScHal3 nagy azonosságot mutat a növény modellben jól jellemzett *Arabidopsis thaliana* AtHal3a fehérjével. Az AtHal3a nem, mint protein foszfatáz szabályozó, hanem mint foszforantotenoil-cisztein dekarboxiláz enzim írták le. Az AtHal3a foszforantotenoil-cisztein

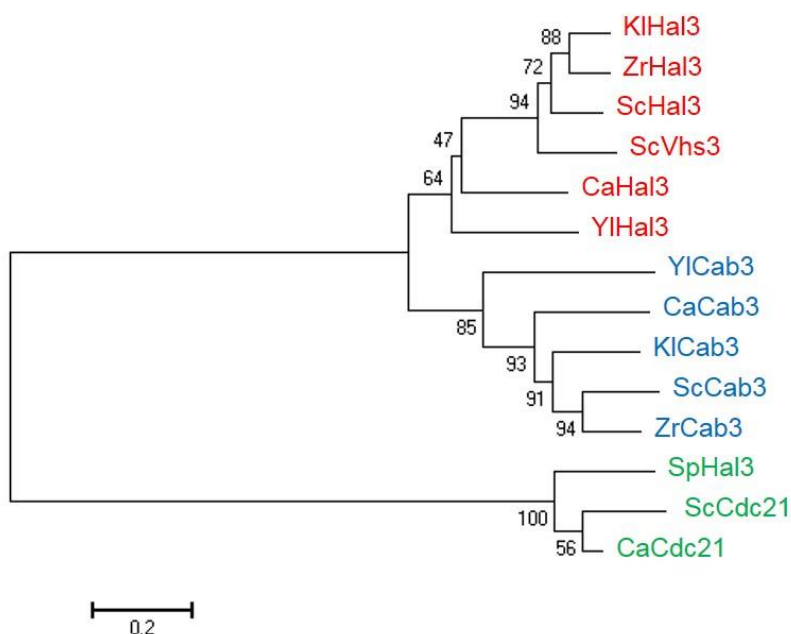
dekarboxiláz enzim aktivitásához esszenciális aminosavak a konzerválódott hisztidin, cisztein és a PAMX₂M motívumban az aszparagin (Kupke, 2001).

A *C. albicans* CaPpz1 foszfatázról korábban kimutattuk, hogy a p-nitrofenil-foszfát szubsztrátot képes defoszforilálni, és hogy ez a foszfatáz aktivitás a *S. cerevisiae*-ből származó ScHal3 fehérjével gátolható (Ádám és mtsai., 2012). A *C. albicans* genomban két Hal3 ortológot kódoló gén található. Az orf19.7378 géntermék szekvenciája nagy hasonlóságot mutat az ScHal3 fehérjével, így CaHal3-nak neveztük el (5. ábra). Ezzel szemben az orf19.3260 terméke jobban hasonlít az ScCab3 fehérjéhez, ezért a CaCab3 nevet adtuk neki. (5. ábra).

CaHal3	1	P-----SSGTTGTATATAAAPPPTTTTATGTCGQNANTDPRLPQDDGKFHVLLGVCALSVAKVKLIV
CaCab3	1	K-LISEPSSQSAIKPLPSSQIVQPIKITGTGSANSSRRGSLKKSNTIVSSPIGPPVFFQQFLSKQDDGKFHILLACGTSVATIKVPLII
ScHal3	1	-----HVLFGATGSLSVFKIKEMI
ScCab3	1	NSIVHMPGDFTIYNPKSNASKPITAKAAPLSANNSTHK-----NKEVITAPTGPVVFTEFFQKEDDKFHLIGATGVSATIKVPLII
AtHal3	1	M-----ENGKRDRQDMEVNTTPKPRVLLAASGSVAATKFGNLC
CaHal3	65	NKLFEIYTPKISIQVILTKASENFILP-----ETLSILENIKVKRIWTDIDEWT-----
CaCab3	90	DKLFQIFTTSKISIQVLTKSSSHFLRG-----CKIHEDVKIWRDEDEWANFSDAY
ScHal3	20	KKLEEIYGRDRISIQVILTQSATQFFEQRYTKKIISSEKLNKMSQYESTPATPVTPTPGQCMAQVVELPFIQLWTDQDEWD-----
ScCab3	85	DKLFKIYGEKISIQLVTKPAEHFLKG-----LKMSTHVKIWRDEDAWV-----
AtHal3	40	HCF-----TEWAEVRAVVTKSSLHFLDK-----LSLPQEVTLTYTDEDEWS-----
CaHal3	115	-----TWKIRSDPVLHIELRRWADILVCPMTANTLSKITLIGICDNLITNVIRAWNTT-----FPILLAPAM
CaCab3	141	NSASTTVCSIMGNDGLNVNKKPKNFPEKLIHLHNELRKWADIMLIAPLSANTLAKIANGIADNLLTSIVRSWCPSTFQQVKKPIIVAPAM
ScHal3	104	-----AWKQRTDPVLHIELRRWADILVAPLTANTLSKIALGLCDNLLTSVIRAWNPS-----YPILLAPSM
ScCab3	130	-----FDAVNKNDTSLSLNLHLHHELRKWADIFLIAPLSANTLAKLANGICNLLTSVMRDWSFL-----TFVLIAPAM
AtHal3	80	-----SWNKIGDPVLHIELRRWADLVLIAPLSANTLGKIAGGLCDNLLTCLIRAWDYT-----KFLFVAPAM
CaHal3	177	DSHSYSSSTTKRQLRLIADMPWIEVLKPEKVFSGFGDIGMGGMDWNEIVNKIVMKLGGYPEVPDEEDEDESKDNIDDSGIVDDDDDD
CaCab3	231	NTFMYTHPIAKQLNIISSPDGIEVLKPEKILV-CGDIQMGGMREWAIEVDVLRVRVHSIKAEQKLLDDEQRLNEEEEEEDDDND
ScHal3	166	VSTFNSMTKKQLQTKKEEMSVTVFKPSEKVMINDIGDIGMGGMDWNEIVNKIVMKLGGYPKNNEEEDDEDEEEDDEEDTEDKNE
ScCab3	199	NTFMYINFMTKHLTSLVQDYFFIQVLKPEKVLII-CGDIQMGGMREWTDIVEIVRRRINEIRKARDEETGDKQEQQEEGADNEDDDD
AtHal3	142	NFLMNNPFTERHLLSL--DELGITLIPPIKRLA-CGDYGNAMAEPSLIYSTVRLFWESQAHQQTGGTS-----
CaHal3	267	DDDDDDDDDDDEDDDDDEEENEESDNVKNVKNK*-----
CaCab3	320	EEGDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDVEEDNEEDVDDTNKRKLVRNNTSNSEELFKKDDDEMIFEITDQEQSEQDDEGEI
ScHal3	256	NNNDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDEDEDEAETPGIIDKHQ*-----
ScCab3	288	EDDEDEDEDEEEALNETASDESNDDEDEDEEDVKTEV*-----
AtHal3		-----
CaHal3		-----
CaCab3	410	VINESRTISFVPSHRQQKIKIPKETQNL*
ScHal3		-----
ScCab3		-----
AtHal3		-----

5. ábra. Hal3 ortológok szekvencia analízise. Az *A. thaliana* AtHal3 referencia fehérjéhez hasonlítottuk az *S. cerevisiae* ScHal3, ScCab3 fehérjék és a *C. albicans* CaHal3, CaCab3 fehérjék szekvenciáját. Aláhúzással jelöltük az AtHal3 szekvenciájában esszenciális aminosavakat és motívumot. Az AtHal3 fehérjében esszenciális hisztidin aminosav mindegyik Hal3 és Cab3 ortológban megtalálható. Az esszenciális cisztein aminosav és az aszparagint tartalmazó PAMNX₂M-t motívum csak az ScCab3 és CaCab3 fehérjékben konzerválódott. Sárga színnel emeltük ki azokat az aminosavakat, amelyekről mutagenézises vizsgálatokból tudjuk, hogy szerepük van a Ppz regulációban. Pirossal a konzerválódott, kékkel a részben konzerválódott aminosavakat jelöltük.

Az 5. ábrán bemutatott szekvencia analízis során kapott eredményekből látható, hogy a referencia *A. thaliana* AtHal3a fehérjéhez mind a CaHal3, mind pedig a CaCab3 fehérjék hasonlóak. A foszopantotenoil-cisztein dekarboxiláz (PPCDC) aktivitásban esszenciális Cys aminosav és PAMNX₂M motívum az ScCab3-hoz hasonlóan megtalálható a CaCab3 fehérjében. Az esszenciális His aminosav az ScHal3-hoz hasonlóan megtalálható a CaHal3 fehérjében, az ScCab3 és CaCab3 fehérjében is megtalálható, de funkcióját a következő fejezetet mutatja be. Mutagenézis vizsgálatok szerint az ScHal3 fehérjében 9 aminosavnak szerepe van a Ppz regulációjában (Munoz és mtsai., 2004). Az 5. ábrán ezeket az aminosavakat sárga színnel emeltük ki. A 9 aminosavból 7 a CaHal3 fehérjében konzerválódott, ezek közül 2 aminosav található meg a CaCab3 fehérjében. A szekvencia összehasonlítás evolúciós hátterének alátámasztására a 6. ábrán egy filogenetikai fa látható, amelyen 5 különböző gombafajból származó 12 Hal3 ortológot és 2 timidilát szintáz ortológot hasonlítottunk össze. A családfán a CaHal3 fehérje (orf19.7378) a Hal3-szerű fehérjék családjába tartozik, míg a CaCab3 (orf19.3260) a Cab3-szerű fehérjék családjába tartozik. Az SpHal3 külön család tagja, mivel timidilát szintáz (Cdc21) domént is tartalmaz.



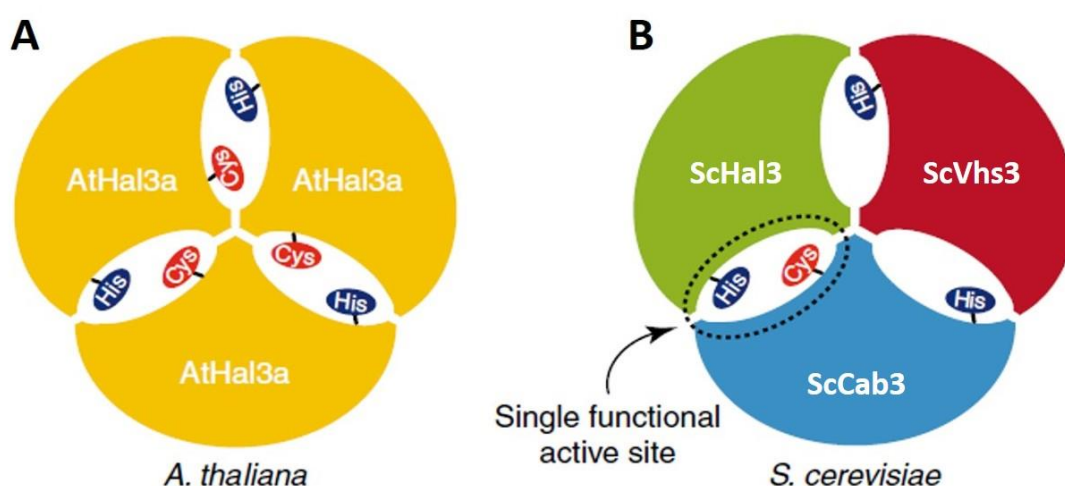
6. ábra. Gomba Hal3 ortológok filogenetikai analízise. A filogenetikai fa analízis Neighbor-Joining módszerrel készült, melyben összesen 14 fehérjét - 12 PPCDC alegységet és két timidilát szintáz fehérjét hasonlítottunk össze. Az alábbi fajok Hal3 szerű fehérjéit vizsgáltuk: *Saccharomyces cerevisiae* (ScHal3, ScVhs3, ScCab3, ScCdc21), *Candida albicans* (CaHal3, CaCab3, CaCdc21), *Schizosaccharomyces pombe* (SpHal3), *Kluyveromyces lactis* (KlHal3, KlCab3), *Yarrowia lipolytica* (YlHal3, YlCab3) és *Zygosaccharomyces rouxi* (ZrHal3, ZrCab3).

Tehát nem csak az *S. cerevisiae* Hal3 homológokkal végzett szekvencia összehasonlítás (5. ábra), hanem a filogenetikai fa elemzése (6. ábra) is alátámasztotta, hogy a CaHal3 a CaCab3 megnevezések helyesen tükrözik az eddig még nem jellemzett géntermékek elsődleges fehérje szerkezet alapján történt azonosítását. A szerkezetek alapján feltételezhető, hogy a CaHal3 a CaPpz1 inhibitora lehet.

3.7 Hal3 homológok szerepe a CoA bioszintézisében

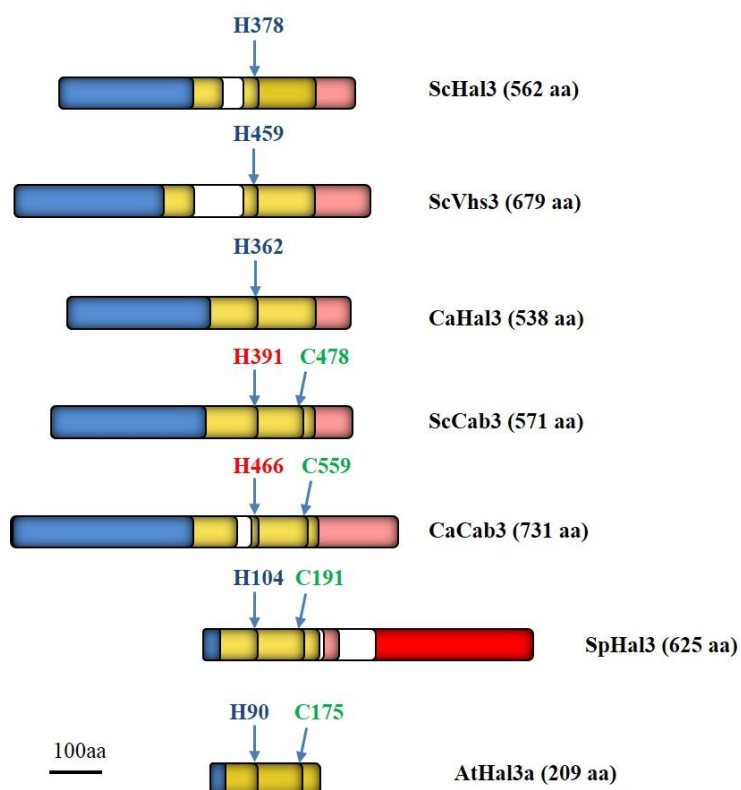
A CoA bioszintézis öt fő lépésből áll, melyből a harmadik lépés során a 4'-foszfoantopantotenoil-ciszteinből foszfoantopantotenoil-cisztein dekarboxiláz enzim segítségével 4'-foszfoantetein képződik. A CoA bioszintézis ezen lépése azért érdekes számunkra, mert a foszfoantopantotenoil-cisztein dekarboxiláz enzim (továbbiakban PPCDC) aktivitása van az ScHal3, ScVhs3 és ScCab3 fehérjék által képzett heterotrimernek (Ruiz és mtsai., 2009). Tehát az ScHal3, ScVhs3 és ScCab3 heterotrimert képezve részt vesz a CoA bioszintézisben, ugyanakkor az ScHal3 és ScVhs3 mint moonlighting protein (moonlighting jelentése: másodállás, mellékfoglalkozás) kötődik az ScPpz1 fehérjéhez és gátolja foszfatáz aktivitását.

Az *Arabidopsis thaliana* Hal3 fehérjének (továbbiakban AtHal3a) 3D szerkezete ismert, így tudjuk, hogy benne három AtHal3a alegység egy homotrimert képez (Albert és mtsai., 2000). A trimer három aktív centrumához szükséges hisztidin és cisztein aminosavak két egymással érintkező alegység különböző szerkezeti elemeiből származnak (7.A ábra).



7. ábra. PPCDC enzim sematikus ábrája. 7.A Az *A. thaliana* AtHal3a fehérjék által képzett homotrimer. 7.B A *S. cerevisiae*-ben a Hal3 homológok által alkotott heterotrimer (Ruiz és mtsai., 2009)

Irodalmi adatok alapján tudjuk, hogy az *cab3* homozigóta deléció letális, és a *hal3/vhs3* kétszeres homozigóta deléció halálos kimenetelű (Ruiz és mtsai., 2004), ami azzal magyarázható, hogy a *S. cerevisiae*-ben a PPCDC egyetlen aktív centrumának kialakításához egy olyan heterotrimerre van szükség, amelyben van egy ScCab3, és ehhez kötődik két ScHal3, vagy két ScVhs3, vagy egy-egy ScHal3 és ScVhs3 fehérje (7.B ábra). A *S. cerevisiae* Hal3 homológok által kialakított PPCDC enzimnek egyetlen aktív centruma van, amelyet az esszenciális ScCab3 cisztein aminosava és az ScHal3 vagy ScVhs3 hisztidin aminosava alakít ki. A hisztidin aminosav konzerválódott az ScCab3 fehérjében is, de nem esszenciális a PPCDC aktivitáshoz (Ruiz és mtsai., 2009).



8. ábra. Hal3 ortológok sematikus összehasonlítása. A *S. cerevisiae* Hal3 paralógok (ScHal3, ScVhs3 és ScCab3), a *S. pombe* Hal3 ortológ (SpHal3), az *A. thaliana* Hal3 ortológ (AtHal3a) és a *C. albicans* két Hal3 ortológja, a CaHal3 és CaCab3 látható az ábrán. Kék színnel az NtD domént jelöltük, sárga színnel a PD domént, rózsaszínnel a savas CtD domént, fehérrel a nem homológ szakaszokat. Piros szín jelöli az SpHal3 azon szakaszát, amely a timidilát szintázzal mutat homológiát. Zárójelben adtuk meg a fehérjéket alkotó aminosavak számát. A PPCDC aktivitásban esszenciális hisztidin aminosavakat késsel, a nem esszenciális aminosavakat pirossal, az aktivitásban nélkülözhetetlen cisztein aminosavakat pedig zöld színnel jelöltük.

Az ScHal3 szerkezetének vizsgálatakor nemcsak a ScPpz1 regulátor funkcióját vizsgálták, hanem a CoA bioszintézisben betöltött szerepét is elemezték (Abrie és mtsai., 2012).

Megállapították, hogy az *in vivo* és *in vitro* PPCDC aktivitáshoz elengedhetetlenül szükséges a centrális PD domén. Az N-terminális NtD domén segíti a ScHal3 fehérjét az ScCab3 alegységhez kapcsolni. A savas C-terminális CtD doménnek viszont nincs lényeges szerepe a fehérje PPCDC aktivitásában. A 8. ábrán látható az ismert és az általunk vizsgálni kívánt Hal3 ortológok sematikus összehasonlítása. A 8. ábrán látható, hogy CaHal3 nagy hasonlóságot mutat az ScHal3 fehérjével, rendelkezik NtD és PD doménnel, illetve savas régióval, megtalálható benne az esszenciális hisztidin aminosav, de az ScHal3-ra jellemző rövid nem-homológ szekvenciát nem tartalmazza. A CaCab3 nagy hasonlóságot mutat az ScCab3 fehérjével, megtalálható benne az esszenciális cisztein és a nem esszenciális hisztidin aminosav is, és tudjuk, hogy konzerválódott benne az ScCab3-ban is megtalálható Asn motívum. A CaCab3 fehérjét hosszabb savas régió és hosszabb NtD domén jellemzi, illetve megtalálható benne egy rövid nem homológ szakasz, amely az ScHal3 fehérjével mutat hasonlóságot.

A szekvencia analízisekből megállapíthatjuk, hogy az orf19.7378 gén termékét helyesen neveztük el CaHal3-nak, hiszen nagy azonosságot mutat az ScHal3 fehérjével, tartalmazza a PPCDC aktivitáshoz nélkülözhetetlen hisztidin aminosavat, és a családfa analízis szerint is a Hal3-szerű fehérjékhez tartozott. Így feltételezésünk szerint a CaHal3 funkcióképes PPCDC alegységként részt vesz a CoA bioszintézisben, és rendelkezik moonlighting funkcióval, tehát Ppz regulátor is.

Az orf19.3260 szekvenciát CaCAB3 génnek neveztük el, amelyet a szekvencia analízis is alátámasztott. A CaCab3 szekvenciája nagy hasonlóságot mutat az ScCab3 fehérjével, hiszen a nagyfokú azonosság mellett tartalmazza a PPCDC aktivitáshoz szükséges cisztein aminosavat és Asn motívumot. Ezért azt várhatjuk, hogy a CaCab3 az ScCab3 fehérjéhez hasonló funkciót láthat el, tehát részt vesz a CoA bioszintézisben, mint PPCDC alegység, de nincs hatása a Ppz foszfatáz aktivitására.

4. Célkitűzések

Első célunk az volt, hogy megvizsgáljuk a CaPpz1 fehérje szerepét a *C. albicans* morfológiai változásaiban. Ehhez rendelkezésünkre álltak a Dr. Ádám Csaba munkatársunk által korábban előállított homozigóta és heterozigóta *cappz1* deléciós mutáns törzsek. Azt terveztük, hogy előkísérletekben klasszikus mikroszkópia segítségével megvizsgáljuk, hogy a *CaPPZ1* gén részleges, illetve teljes eliminálása hogyan hat a gomba morfológiájára, illetve hifa képzésére. Amennyiben jelentős különbségeket találunk a mutáns és a szülői törzsek között a morfológiai átmenet kinetikájának tanulmányozására adoptálni kívántuk az emlős sejtek vizsgálatára korábban már kidolgozott videomikroszkópiás eljárásokat, illetve kiértékelési módszereket.

A CaPpz1 fehérje szabályozási lehetőségének felderítése érdekében az volt a célunk, hogy meghatározzuk az általunk felismert két ScHal3 ortológ, a CaHal3 és a CaCab3 szerepét. A fiziológias funkciók megállapítására felhasználhattuk az Prof. Joaquin Arinó és munkatársai által (Barcelónai Autonóm Egyetem, Spanyolország) előállított *S. cerevisiae* mutáns törzseket, amelyeket a *C. albicans* fehérjék overexpressziójával kívántunk komplementálni. Az élesztő mutánsok felhasználásával először a CaHal3 és a CaCab3 szerepét kívántuk tisztázni az esszenciális PPCDC aktivitás biztosításában. Ezt a kérdést az egyébként letális *cab3* illetve *hal3/vhs3* mutánsok komplementálását tetrád analízis segítségével lehet eldönteni.

A CaHal3 és CaCab3 fehérjék foszfatáz Z regulációjában játszott szerepét *in vitro* és *in vivo* kísérletekben kívántuk ellenőrizni. Ehhez a két fehérjét megfelelő címkével ellátva bakteriális, illetve élesztő sejtekben kell termeltetni, majd pull down kísérletek segítségével tudjuk megvizsgálni kölcsönhatásukat a rekombináns CaPpz1 foszfatázzal. Az irodalmi adatok alapján arra számíhattunk, hogy a Hal3 ortológok a foszfatáz katalitikus doménjéhez kötődnek, ezért a fehérje-fehérje kölcsönhatási vizsgálatokat a rekombináns CaPpz1-Cter katalitikus doménnel is el kívántuk végezni. Amennyiben sikerül igazolni a foszfatáz és a feltételezett regulátorok közötti fizikai kölcsönhatást megvizsgálhatjuk a CaHal3 és CaCab3 hatását az enzim aktivitására. Végül meg kívántuk határozni a kölcsönhatás fiziológias jelentőséget. Ennek érdekében az *S. cerevisiae* *hal3* deléciós mutánsban kell expresszálni a CaHal3 és CaCab3 fehérjéket, és meg kell vizsgálni, hogy különböző stressz körülmények között a *Candida* fehérjék képesek-e a foszfatázzal kapcsolatba hozható mutáns fenotípusok komplementálására.

5. Anyagok és módszerek

5.1 Anyagok

5.1.1 Vegyszerek

A munkánk során gyakran használt vegyszereket az alábbi gyártóktól/forgalmazóktól szereztük be:

Bio-Rad: AMPER, agaróz, SDS, Triton X-100

Clontech Laboratories: LiAc, PEG, 1xTE, ssDNS

Gyógyszertári: ampicillin, kloramfenikol, koffein

Merck: proteináz K, benzamidin

PAA Laboratories: RPMI, FBS

Reanal: β -ME, $MnCl_2$, imidazol, LiCl, KCl

Serva: Ribonuclease A, TEMED

Sigma-Aldrich: Akrilamid, DTT, Hygromicin B, IPTG, kloroform, fenol, PMSF, Protease inhibitor cocktail, kanamycin, tyrosol, farnesol, hygromycin B,

VWR: bacteriological agar, BSA, Bis-akrilamid, Coomassie brilliant blue (R-250), Gel red, ecetsav, EDTA, etanol, kloroform, glicerin, glicin, metanol, nátrium-acetát, tripton, Tris, NaCl, glükóz

A listán nem szereplő speciális anyagok eredetét a következő fejezetekben külön jeleztem.

5.1.2 Táptalajok

INE tápleves: 10% nátrium-acetát, 1% élesztőkivonat, 0,5% glükóz (pH 7.2)

LB tápleves: 1% tripton, 0,5% élesztőkivonat (Himedia) 1% NaCl

Sabouraud tápleves: 1% mycological peptone (Oxoid), 2% glükóz

SD-Ura tápleves: 0,67% élesztő alapú nitrogénforrás aminosavak nélkül (Difco), 2% glükóz, 1X uracil- mentes törzsoldat [400 mg/l adenin-szulfát, 20 mg/l L-arginin, 20 mg/l L-hisztidin, 20 mg/l L-lizin, 60 mg/l L-leucin, 20 mg/l L-metionin, 50 mg/l L-fenilalanin, 30 mg/l L-tirozin, 40 mg/l L-triptofán, 150 mg/l L-valin (Sigma-Aldrich)]

SOC tápleves: 1% tripton, 0,5% élesztőkivonat (Himedia) 0,085 mM NaCl, 0,25 mM KCl (pH 7,0), 100 mM $MgCl_2$

YPD tápleves: 1% élesztőkivonat (Himedia), 2% bacto pepton (Difco), 2% glükóz (pH 5,8)

A hasonló megnevezésű szilárd tápagarak további 2% bacteriological agart (VWR) tartalmaztak.

5.1.3 Oldatok, pufferek

DNS minták kivonása és vizsgálata során a következő oldatokat használtuk:

Kivonópuffer: 50 mM Tris, 50 mM EDTA, 2% SDS + frissen 1% β -ME

TAE: 40 mM Tris, 20 mM ecetsav, 1 mM EDTA, pH 8,5

6 x DNS mintapuffer: 40% szacharóz, 0,416% brómfenolkék, 10 x TAE

TE: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8

LiAc oldat: 0,1 M LiAc; TE pH 7,5

PEG oldat: 0,1 M LiAc; 40% PEG; TE pH 7,5

Affinitás kromatográfia során használt oldatok

Lízis puffer I: 25 mM Tris-HCl pH 7.5, 250 mM NaCl, 0,1% Triton X-100, 1 mM MnCl_2 , 5 mM Imidazol, 1 mM β -ME, 1 mM PMSF, 1 mM benzamidin, 1x proteáz inhibitor koktél

Lízis puffer II: 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 10% glicerin, 0,1% Triton X-100, 2 mM DTT, 0,5 mM PMSF, 0,5 mM benzamidin, 1x proteáz inhibitor koktél

Mosó I. puffer: 25 mM Tris-HCl pH 7.2, 800 mM NaCl, 1 mM MnCl_2 , 20 mM imidazol, 1 mM β -ME, 1 mM PMSF, 1 mM benzamidin, 1x proteáz inhibitor koktél

Mosó II. puffer: 25 mM Tris-HCl pH 7.2, 200 mM NaCl, 1 mM MnCl_2 , 30 mM imidazol, 1 mM β -ME, 1 mM PMSF, 1 mM benzamidin, 1x proteáz inhibitor koktél

Eluáló puffer: 25 mM Tris-HCl pH 7.2, 200 mM NaCl, 1 mM MnCl_2 , 200 mM imidazol, 1 mM β -ME, 1 mM PMSF, 1 mM benzamidin, 1x proteáz inhibitor koktél

Prescission puffer: 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 10% glicerin, 1 mM EDTA, 2 mM DTT

Poliakrilamid gélelektroforézis és Western blot során használt oldatok

5 x SDS mintapuffer: 50% glicerin, 10% SDS, 100 mM DTT, 0,31 M Tris-HCl (pH 6.8), 0,01 % brómfenolkék

SDS gélfesték: (250 ml-re) 1,25 g Coomassie Brilliant Blue R-250, 454 ml 1:1:1 arányú metanol: steril H_2O , 46 ml 96 % ecetsav

Alsó gél puffer: 1,5 M Tris (pH: 8,8), 0,4 % SDS

Felső gél puffer: 0,5 M Tris, (pH: 6,8), 0,4 % SDS

Akrilamid – BIS-akrilamid: 30 % akrilamid, 0,8 % bis-akrilamid

10 x Elfő puffer: 144,1 g glicin, 30,3 g Tris-HCl, 10 g SDS, 1000 ml H₂O

Elfő mosófolyadék: 7 % ecetsav, 12 % etanol (96 %-os)

5 x Transzfer puffer: 15,5 g Tris-HCl, 72,05 g glicin, 1000 ml H₂O

TBST: 20 mM Tris-HCl, (pH 7,5), 500 mM NaCl, 0,05 % Tween 20, 0,2 % Triton-X-100

TM puffer: 20 mM Tris-HCl (pH 7,4), 0,1% β-ME

5.2 Módszerek

5.2.1 *E. coli* sejtek tenyésztése és vizsgálata

Munkánk során az 1. táblázatban felsorolt *E. coli* törzseket használtuk.

1. táblázat. Az általunk használt *E. coli* törzsek

törzs	genotípus ¹
DH5α	F ⁻ endA1 glnV44 thi1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20 ϕ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK ⁻ mK ⁺), λ ⁻
JM109	e14- (McrA ⁻) recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17(rK ⁻ mK ⁺) supE44 relA1 Δ(lac-proAB) [F' traD36 proAB lacIq ZΔM15]
BL21 DE3 RIL	E. coli B F ⁻ ompT hsdS(rB ⁻ mB ⁻) dcm ⁺ Tetr ^r E. coli gal λ (DE3) endA Hte [argU ileY leuW Camr]

¹A törzsek genotípusa az (http://openwetware.org/wiki/E._coli_genotypes#BL21.28DE3.29) oldalról származik.

JM109 törzset Dr. Boratkó Anitától (Debreceni Egyetem, Orvosi Vegytani Intézet), a BL21 DE3 RIL törzset Prof. Joaquín Ariño-tól (Barcelónai Autonóm Egyetem, Spanyolország) kaptuk. A DH5α törzset a Thermo Fisher Scientific gyártótól szerezzük be. Az *E. coli* törzseket minden esetben LB táptalajban tenyésztettük 37°C-on. A DH5α és JM109 törzseknek nincs saját antibiotikum rezisztenciájuk. A BL21 DE3 RIL sejtek kloramfenikol rezisztenciát kódoló plazmidot hordoznak, ezért 34 μg/ml végkoncentrációban kloramfenikolt adtunk a táptalajukhoz. A pGEX-6P-1 és pWS93 plazmidokkal transzformált sejtek ampicillin rezisztenciát hordoznak, ezért 100 μg/ml-es koncentrációban ampicillint adtunk a tenyészetekhez. A pET28 plazmid kanamycin rezisztenciát hordoz, ezért 50 μg/ml-es végkoncentrációban adtunk pET28 plazmidot tartalmazó sejtekhez kanamycint. Egyéjszakás tenyészethez 1 telepet vagy egy pipettahegynyi törzsoldatot tettünk a megfelelő

antibiotikummal kiegészített 5 ml táplevesbe, és 180 rpm rázatás mellett növesztettük a sejteket 16 órán át. Fehérje expresszió során 500 ml LB táplevest antibiotikumokkal kiegészítettünk és 2-3 ml egyéjszakás tenyészetet tettünk hozzá.

5.2.2 *Candida albicans* sejtek tenyésztése és vizsgálata

Munkánk során a 2. táblázatban található *Candida albicans* törzseket használtuk fel. A kontroll törzset (QMY23) Prof. Alexander Johnson-tól (Department of Microbiology and Immunology, University of California-San Francisco), az anyai törzset (SN87) pedig Dr. Susan Noble-től (Department of Microbiology and Immunology, University of California-San Francisco) kaptuk. A mutáns (*cappz1*) és menekített törzseket (CaPPZ1-HIS1 és CaPPZ1-LEU2) laborunkban állította elő Dr. Ádám Csaba és Dr. Kovács László.

2. táblázat. A munkánk során felhasznált *C. albicans* törzsek

Törzs	Genotípus	Hivatkozás
SC5314	<i>vad típus</i>	Gillum és mtsai. (1984)
SN87	<i>ura3Δ-iro1Δ::imm⁴³⁴/URA3-IRO1, his1Δ /his1Δ, leu2Δ /leu2Δ</i>	Noble és Johnson (2005)
QMY23	<i>his1Δ/his1Δ, leu2Δ::C. dubliniensis HIS1 /leu2Δ::C. maltosa LEU2,URA3/ura3Δ::imm434, IRO1/iro1Δ::imm434</i>	Mitrovich és mtsai. (2007)
<i>cappz1</i>	<i>ura3Δ-iro1Δ::imm⁴³⁴/URA3-IRO1, his1Δ /his1Δ, leu2Δ /leu2Δppz1Δ:: C. dubliniensis HIS1/ppz1Δ:: C. maltosa LEU2</i>	Ádám és mtsai. (2012)
CaPPZ1-HIS1	<i>ura3Δ-iro1Δ::imm⁴³⁴/URA3-IRO1, his1Δ /his1Δ, leu2Δ /leu2Δppz1Δ::HIS1/ppz1Δ::LEU2::PPZ1</i>	Ádám és mtsai. (2012)
CaPPZ1-LEU2	<i>ura3Δ-iro1Δ::imm⁴³⁴/URA3-IRO1, his1Δ /his1Δ, leu2Δ /leu2Δ,ppz1Δ::LEU2/ppz1Δ::HIS1::PPZ1</i>	Ádám és mtsai. (2012)

C. albicans tenyésztés során a különböző törzseket YPD táplevesben növesztettük 37°C-on szilárd lemezen 1-2 napig, majd egyéjszakás tenyészetet készítettünk 18 órán át rázatás nélkül (Ádám és mtsai., 2012). DNS izolálás céljára friss 50 ml-es tenyészetet készítettünk 1-2

ml egyéjszakás tenyészetből kiindulva. Az elegyet 37 °C-on 140 rpm rázatás mellett 8 órán át növesztettük. A sejteket PBS (Gibco) oldattal mostuk és -70°C-on tároltuk.

5.2.2.1 Hifa növekedés vizsgálata

A hifa növekedés vizsgálatát az Ádám és mtsai. (2012) publikációban leírtak szerint végeztük el. SN87 és *cappz1* törzsekből, illetve a menekített mutánsokból (CaPPZ1-LEU2 és CaPPZ1-HIS1) 1-1 telepet 5 ml Sabouraud táplevesben növesztettünk 18-19 órán át 37 °C-on rázatás nélkül. A felnőtt kultúrákból 25 ml tenyészetet készítettünk Sabouraud táplevessel, melynek optikai denzitása $OD_{620}=0,1$ volt. A kísérletet 5% FBS jelenlétében is elvégeztük. Az elegyet 37°C-on 140 rpm rázatás mellett növesztettük és 60, 90 és 120 perc után 1-1 ml mintát vettünk. A mintákat centrifugálással összegyűjtöttük és 1xPBS-sel (Gibco) mostuk, majd 50 µl 1xPBS-ben (Gibco) vettük fel. A sejteket Olympus BX40 mikroszkóp alatt lefotóztuk, majd a képeket az Image J programmal kiértékeltek.

5.2.2.2 Morfológiai elemzés time-lapse videomikroszkópiával

Videomikroszkópos analízishez a QMY23 és *cappz1* törzseket 37 °C-on (Ádám és mtsai., 2012), növesztettük. A sejteket először szilárd Sabouraud tápagarra szélesztettük, majd 1-1 telepet 5-5 ml Sabouraud folyékony táplevesben növesztettünk 18 órán keresztül rázatás nélkül. A sejteket PBS-sel (Gibco) mostuk, majd $1-2 \times 10^5$ sejtet T-25 flasksba tettük, amelyekben 10% FBS tartalmazó 5 ml RPMI oldat volt. Az így elkészített sejtszuszpenziót 37 °C-on, 5% CO₂ jelenlétében 5 órán keresztül tartottuk inkubátorban (SANYO MCO18-AC) (Lo és mtsai., 1997). A tenyésztés során 10 darab mikroszkópos képet készítettünk 5 másodpercenként, amelyeket átlagoltunk. Minden megfigyelés 4 párhuzamos mintával készült. A fotófelvétel az inkubátorba helyezett 4 Olympus mikroszkóppal, és a hozzájuk rögzített CCD kamerával történt. A módszer részletes leírása a Nagy és mtsai. (2014) cikkben olvasható.

5.2.3 *S. cerevisiae* sejtek tenyésztése és vizsgálata

In vitro vizsgálatokban, illetve a különböző Hal3 homológok élesztőben való termeltetése során a 3. táblázatban látható élesztő törzseket használtuk fel.

A *S. cerevisiae* törzseket Prof. Joaquin Ariño-tól (Barcelónai Autonóm Egyetem, Spanyolország) kaptuk. A CCV186 mutáns kollaborációs partnerünk készítette úgy, hogy a BY4741 törzsből létrehozott *hal3* mutáns törzsben található 2.0 kb hosszú

hal3::kanMX4kazettát amplifikálta a Hal3-200-Hal3-3'_term1 primerpárral és ezt a szakaszt transzformálta a JC010 törzsbe.

3. táblázat. Kísérleteink során használt vagy előállított *S. cerevisiae* törzsek

Törzs	Genotípus	Hivatkozás
BY4741	<i>MATa his3 Δ 1 leu2 Δ met15Δ ura3Δ</i>	Winzeler és mtsai. (1999)
BY4741 <i>ppz1::KanMX4</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ met15Δ ura3Δ</i> <i>ppz1::kanMX4</i>	Winzeler és mtsai. (1999)
<i>hal3::KanMX4</i>	BY4741 <i>hal3::KanMX4</i>	Winzeler és mtsai. (1999)
MAR25	<i>MATa/a ura3-52 leu2-3,112 his4 trp1-1 can-1r, cab3::KanMX4/CAB3</i>	Ruiz és mtsai. (2009)
AGS4	<i>MATa/a ura3-52 leu2-3,112 his4 trp1-1 can-1r, hal3::LEU2/HAL3 vhs3::KanMX4/VHS3</i>	Ruiz és mtsai. (2004)
JC010	<i>MATa PPZ1 PPZ2 HAL3 ura 3-52 leu2-3, 112 trp1-1 his4 can-1^r, slt2::LEU2</i>	Vissi és mtsai. (2001)
JA-100	<i>MAT a leu2-3,112 ura3-52 trp1-1 his4 can1r (ssd1v)</i>	de Nadal és mtsai. (1998)
CCV186	JA-100 <i>slt2::LEU2 hal3::KANMX4</i>	Petrényi és mtsai. (2016)

A 3. táblázatban látható *S. cerevisiae* törzseket YPD táplevesben 28 °C-on tenyésztettük. A különböző törzseket a törzsoldatból szilárd YPD tápagarra oltottuk le. A felnőtt telepeket 5 ml YPD táplevesbe tettük, és 180 rpm rázatás mellett 18 órán keresztül növesztettük. A törzsek pWS93 plazmiddal való transzformálása után a sejteket SD-Ura tápagaron szelektáltuk 28 °C-on (Adams és mtsai., 1997).

5.2.3.1 Növekedési teszt

Munkánk során vizsgáltuk, hogy a különböző stressz hatású anyagok hogyan hatnak az élesztősejtek növekedésére. Különböző Hal3 homológ szekvenciát tartalmazó pWS93 plazmidokkal transzformáltunk vad típusú (BY4741) és különböző mutáns (*hal3*, *slt2* és *slt2/hal3* deléciós mutáns) *S. cerevisiae* sejteket. A transzformánsokat SD-Ura tápagaron növesztettük 28°C-on 2-3 napig, majd 1-1 telepet 5 ml SD-Ura tápagarban növesztettünk 18-19 órán át 28 °C-on. A tenyészet optikai denzitását megmértük 660 nm-en. Minden tenyészetet két azonos koncentrációra: OD₆₆₀=0,005 illetve 0,0005 értékekre hígítottunk. Mindkét hígításból

3-3 µl-t cseppentettünk ki a kontroll YPD tápagra és a különböző koncentrációban stressz hatású anyagokat tartalmazó YPD tápagra. 48 és 72 óra elteltével a lemezeket lefénypéztük (Posas és mtsai., 1995). Az előbbieken említett transzformánsokkal növekedési vizsgálatot végeztünk alacsony és magas kálium-ion koncentráció (1 mM és 50 mM) mellett, hogy megvizsgáljuk a ScHal3 fehérjék káliumtranszportban betöltött szerepét (Barreto és mtsai., 2011). Az eredeti „kálium-mentes táptalaj” minimális (15 µM) káliumionot tartalmazott (Navarrete és mtsai., 2010), ezt egészítettük ki 1 mM és 50 mM értékre, és ebben a közegben vizsgáltuk a transzformánsok növekedését.

5.2.3.2 Tetrád analízis

Tetrád analízissel lehetőség van haploid sejtek életképességének vizsgálatára. A transzformált *S. cerevisiae* sejtekből 1-1 telepet SD-Ura táplevesbe oltottunk le és növesztettük 28°C-on 180 rpm rázatás mellett 18-19 órán át. A sejteket centrifugálással összegyűjtöttük és desztillált vízzel mostuk, majd INE tápleves adtunk a sejtpellethez és növesztettük több napon át 28 °C-on 180 rpm rázatás mellett. A sejteket centrifugálással összegyűjtöttük és desztillált vízzel mostuk, majd 6,25 mg zimoliázt tartalmazó 250 µl desztillált vízben szuszpendáltuk fel a sejteket. A tetrádokat MSM 300 Yeast Dissection Microscope (Singer Instruments) mikroszkóppal választottuk szét. A tetrádok genotípusát további szelektáló tápagarakon való növesztéssel határoztuk meg (Sherman, 1991).

5.2.4 DNS klónozása és vizsgálata

5.2.4.1 Genomi DNS preparálás

A *CaHAL3* és *CaCAB3* leolvasási keretének felszorzozásához *C. albicans* genomi DNS preparátumot állítottunk elő (Lee és mtsai., 1988). A centrifugálással összegyűjtött SN87 sejteket kézi potterrel eldörzsöltük, és 500 µl kivonó pufferrel felszuszpendáltuk. 100 µg/ml végkoncentrációban RNáz A-t adtunk a szuszpenzióhoz, és 37 °C-on vízfürdőben inkubáltuk. Ezután következett a proteináz K kezelés, amelyet 100 µg/ml végkoncentrációban adtunk a sejtekhez és 55 °C-on inkubáltuk 1 órán át. Kétszer elvégeztük a fenol-kloroformos extrakciót, mely során 1:1 arányban adtunk a mintákhoz fenol-kloroformot. Alapos keverés után elválasztottuk a szerves és vizes fázist. 2 térfogat abszolút etanolt és 250 mM végkoncentrációban NaCl-ot adtunk a felső, vizes fázishoz. Az elegyet -20 °C-on tartottuk 30 percig, majd centrifugálással ülepítettük a kicsapódott DNS-t. A pelletet 70%-os etanollal

mostuk, majd SpeedVac (Savant) vákuum centrifugában szárítottuk, és 50 µl desztillált vízben oldottuk fel. A nukleinsavat tartalmazó minták koncentrációját és tisztaságát NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific) készülékkel határoztuk meg. A preparátumok tisztaságát agaróz gélelektroforézissel is ellenőriztük.

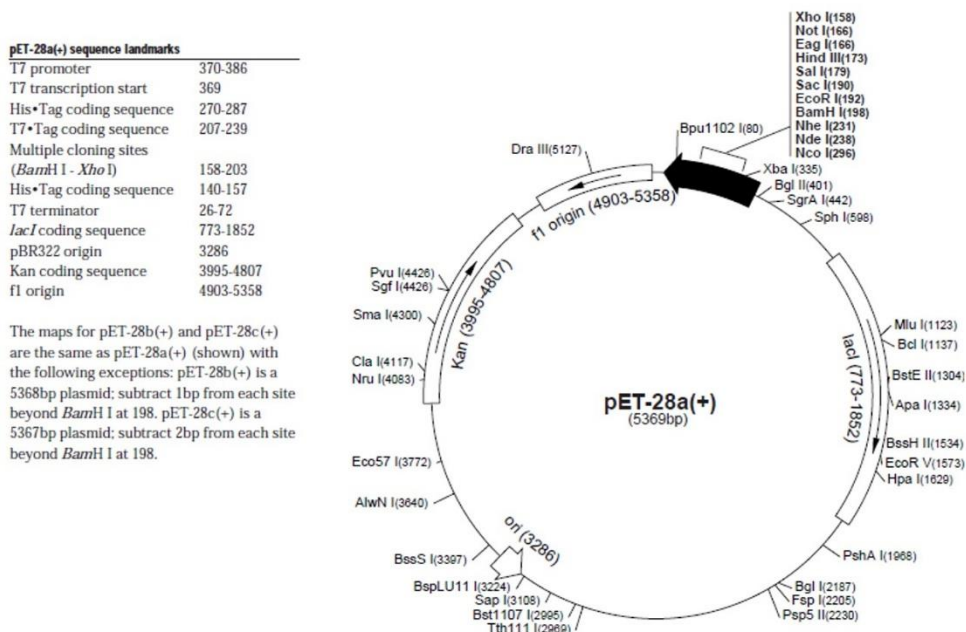
5.2.4.2 Plazmid DNS preparálás

Plazmid preparálás során mindig egyéjszakás baktérium tenyészetből indultunk ki. 2x2 ml tenyészetből a sejteket 2 percig maximális fordulaton végzett centrifugálással összegyűjtöttük, és a felülúszót eltávolítottuk. A továbbiakban az EZ-10 spin column plazmid DNA miniprep (Bio Basic) kit leírása szerint jártunk el

(<https://store.biobasic.com/resources/productinfo/Kit%20Brochure%20Complete%20v20.pdf>).

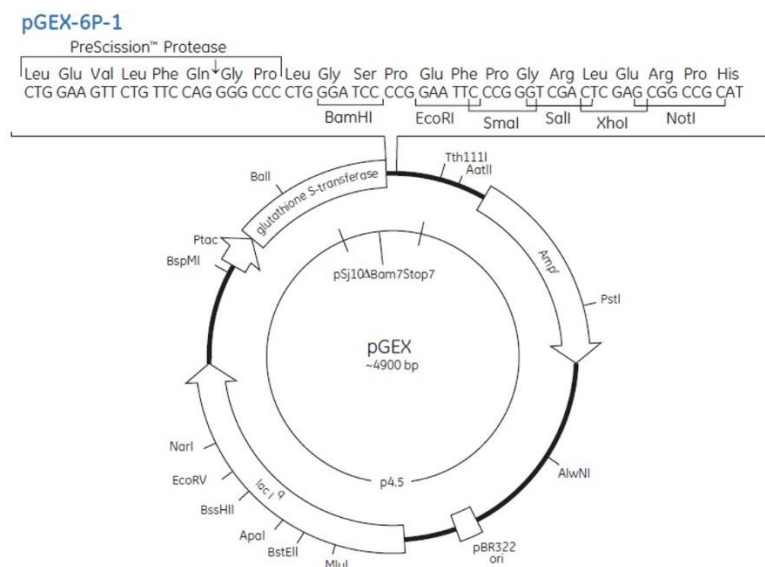
Munkám során az alábbi plazmid vektorokat használtuk:

A pET28a vektor segítségével BL3 DE3 RIL *E. coli* törzsben termeltettük a CaPpz1 fehérjét. A pET28a vektorról N-terminális oldalon 6xHis címkével ellátott fehérjék termelődnek (9. ábra), így Ni-NTA gyanta segítségével affinitás kromatográfiával tisztítható a baktériumban expresszált fehérje. A pET28a-CaPpz1 konstruktot Dr. Ádám Csaba készítette el, a teljes ORF-et az NdeI és XhoI hasítóhelyek közzé klónozták a pET28 vektorban (Ádám és mtsai., 2012).



9. ábra. A pET28a vektor térképe (<https://www.staff.ncl.ac.uk/p.dean/pET28.pdf>)

A pGEX-6P-1 vektor alkalmas bakteriális rendszerben fehérje termeltetésre (10. ábra). A termelődött fehérjék N-terminális végükön GST-címkével fűzínáltak, így Glutation Sepharose 4B gyanta segítségével, affinitás kromatográfiával lehet tisztítani a fehérjét. A GST-címke PreScission proteázzal (GE Healthcare) a tisztítás végén eltávolítható.

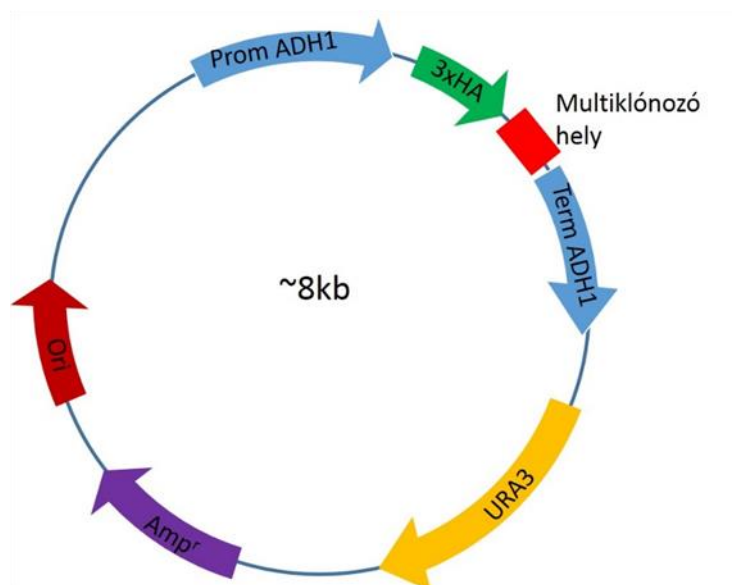


10. ábra. pGEX-6P-1 plazmid sematikus ábrázolása

(https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1314787424814/litdoc28962284_20161014223929.pdf)

Munkánkhoz Prof. Joaquín Ariño-tól (Barcelónai Autonóm Egyetem, Spanyolország) készen kaptuk a pGEX-6P-1-ScPpz1 és pGEX-6P-1-ScPpz1-Cter konstruktokat (Garcio-Gimeno és mtsai., 2003). A *CaHAL3*, *CaCAB3* teljes leolvasási keretét, illetve a CaPpz1 C-terminális doménjét kódoló génszakaszt a pGEX-6-P1 vektorba klónoztuk. Az intronmentes *CaHAL3* és *CaCAB3* géneket EcoRI és XhoI hasítóhellyel, míg a CaPpz1-Cter szekvenciáját BamHI és XhoI hasítóhellyel klónoztuk a pGEX-6P-1 vektorba.

A pWS93 plazmidot *S. cerevisiae* sejtekben való fehérje termeléshez használtuk (11. ábra). A plazmidot Prof. Joaquin Ariño-tól kaptuk. A plazmidról nagy mennyiségű fehérje termelődik, amiért az erős ADH1 promóter felelős. A fúziós fehérjék termelődése N-terminális véghez kapcsolt HA címkével történik (Song és mtsai., 1998).



11. ábra. pWS93 plazmid sematikus térképe Song és mtsai. (1998) munkája nyomán.

A pWS93 vektort és az *ScHAL3*, illetve *ScCAB3* teljes leolvasási keretét tartalmazó pWS93 konstruktokat (pWS93-*ScHAL3*, pWS93-*ScCAB3*) Prof. Joaquin Ariño bocsájtotta rendelkezésünkre (Ruiz és mtsai., 2009). A pWS93-*CaHAL3* és pWS93-*CaCAB3* konstruktok előállításához a pGEX-6P-1-*CaHAL3* és pGEX-6P-1-*CaCAB3* konstruktokból az inzertet *EcoRI* és *XhoI* restrikciós enzimekkel kihalásítottuk, majd *EcoRI* és *SalI* enzimekkel megemésztett pWS93 plazmidba ligáltuk.

5.2.4.3 PCR

Munkánk során a klónozáshoz a célnak megfelelően módosított inzerteket polimeráz láncreakcióval sokszoroztuk. A 4. táblázatban láthatók a klónozáshoz használt PCR primerek és target szekvenciák.

A *CaHAL3* teljes leolvasási keretét Pfu polimerázzal (Fermentas) sokszoroztunk fel a gyártó leírása alapján. A további PCR reakciók során Phusion (Thermo Scientific) és Phire polimeráz (Thermo Scientific) enzimeket használtam a gyártó utasításai szerint. A PCR reakciókat Eppendorf Mastercycler® készülékben végeztük el. A PCR termékeket további vizsgálatokhoz Amicon (Ultra-0.5 Centrifugal Filter Devices) kittel tisztítottuk a gyártó leírása alapján.

4. táblázat. Klónozáshoz használt primerek

Primer neve	Szekvencia, 5'-3'	Célszekvencia
Hal3-300	GAAGTCACAGAGTGCTCTTGG	<i>hal3::KanMX4</i> genomi DNS
Hal3-3'_term1	GTGACATCGATACCTTCACTTAC	<i>hal3::KanMX4</i> genomi DNS
CaHAL3EcoRI	AATTGAATTCATGCCTTCTGATACTCCCAAAG	<i>CaHAL3</i> ORF
CaHAL3XhoI	TCATCTCGAGTCAATTTATTCTTGACATTCTCTT TAAC	<i>CaHAL3</i> ORF
CaCabEcoRI	AATAGAATTCATGTCCCAAGATTCTTCAGATC	<i>CaCAB3</i> ORF
CaCabXhoI	TTATCTCGAGTCAAATAAGATTTTGAGTTTCT TTAGG	<i>CaCAB3</i> ORF
CaPpz1EcoRI	ATAGAATTCATGGGTTCTAATTCA	<i>CaPPZ1-3</i> ORF
CaPpz1XhoI	CCTCTCGAGCTTTATGTAGATTC	<i>CaPPZ1-3</i> ORF
CaPPZ- CterBamHI	AAAGGATCCATAGATATAGATTCATTAATTG ATAAATTA	<i>CaPPZ1-3</i> ORF
CaPPZ- CterXhoI	TTTACTCGAGCTTTATGTAGATTTCTTTC	<i>CaPPZ1-3</i> ORF

A szekvenciákon félkövérrel jelöltük a START kodonokat, aláhúzással a STOP kodonokat. A dőlt nukleotidok a restrikciós hasító helyeket jelölik. A primereket a Sigma-Aldrich-től szereztük be.

A folt tesztek igazolására *S. cerevisiae* sejtekkel kolónia PCR-t végeztük, amely során Taq polimerázt (Fermentas) használtunk a gyártó leírása alapján. A vizsgálat során *S. cerevisiae* sejtekkel végzett növekedési teszt után felnőtt telepekből egy-egy pipettahegynyi sejtet tettünk a PCR reakcióba, majd a reakciót Eppendorf Mastercycler® készülékben végeztük el a CaHAL3EcoRI-CaHAL3XhoI és CaCab3EcoRI-CaCab3XhoI primerpárokkal (4. táblázat).

5.2.4.4 Restrikciós hasítás

Restrikciós emésztés során két különböző gyártó enzimjeit használtuk. Inzert és vektor klónozáshoz való előkészítését Promega gyártmányú enzimekkel végeztük. A gyártó által javasolt módon összeállítottuk a reakciómixet és 2 órán keresztül 37°C-on inkubáltuk a reakciót. Az ellenőrző restrikciós hasítást általában Fast Digest (Thermo Scientific) enzimekkel

végeztünk. A gyártó leírása szerint állítottuk össze a reakcióközeget, és 20 percig inkubáltuk 37°C-on. A restrikciós emésztést minden esetben agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük.

5.2.4.5 Agaróz gélelektroforézis

A nukleinsavak méretének ellenőrzésére agaróz gélelektroforézist használtunk. 1x TAE pufferbe oldottunk 0,8% vagy 1% agarózt és többszöri forralással feloldottuk. Az elegyet kézmelegre hűtöttük, és Gel Red-et (Biotium) adtunk hozzá 20000x hígításban. A megszilárdult gélre felvittük a mintákat, és TAE pufferben 90V-on végeztük az elektroforézist. Agaróz gélelektroforézis során minden esetben 1kb-os DNS standardot használtunk (Invitrogen). Alpha Innotech FluorChem FC2 Imaging System készülékkel detektáltuk és rögzítettük a gélképet. A 0,8%-os agaróz gélben elválasztott DNS fragmentumokat gélextrakciós kit (Qiagen) segítségével, a gyártó leírása alapján izoláltuk.

5.2.4.6 DNS klónozás

A restrikciós endonukleázokkal emésztett vektorokat alkalikus foszfátáz (Promega) kezelésnek vetettük alá, hogy a plazmidok újbóli összezáródását megakadályozzuk. A reakcióelegy összeállítása során a gyártó utasítása szerint jártunk el. A megfelelő restrikciós enzimekkel és foszfátáz kezeléssel előállított inzerteket a vektorokkal Promega gyártmányú ligázzal kapcsoltuk össze a gyártó leírása alapján. A ligálási elegyeket, illetve a készen kapott plazmidokat baktérium- vagy élesztősejtekbe transzformáltuk.

Kompetens *E. coli* sejtek készítése során egyéjszakás előtenyészetből és LB táplevesből friss tenyészetet készítettünk, amelyet 2-3 óráig 37°C-on növesztettünk ($OD_{600}=0,5-0,6$). A sejteket centrifugálással összegyűjtöttük, és 50 mM-os $CaCl_2$ -ban szuszpendáltuk, majd jégen tartottuk (30 perc). Centrifugálással ismét összegyűjtöttük a sejteket, és 50 mM $CaCl_2$ oldatban vettük fel. A sejteket szétporcióztuk, és felhasználásig -70°C-on tároltuk.

A kompetens *E. coli* sejthez 10 μ l ligálási elegyet vagy 100 ng tiszta plazmid DNS-t adtunk és 40 percig jégen tartottuk. Az elegyet 1 perces hősokknak vetettük alá (42°C), majd SOC táplevessel 37°C-on egy órán át 180 rpm rázatással inkubáltuk. Ezután a megfelelő antibiotikumot tartalmazó szilárd LB tápagarra szélesztettük az elegyet, és 37°C-on 18 órán át inkubáltuk (Dombrádi, 2004).

S. cerevisiae sejtek transzformálásakor egyéjszakás tenyészetből 2-3 ml-t 50 ml YPD-be tettünk és 3 órán keresztül növesztettük a sejteket. A sejteket centrifugálással gyűjtöttük össze, mostuk steril vízzel és LiAc oldattal szuszpendáltuk fel. Majd az alábbi elegyet 28°C-on 30 percig ráztuk: 10 μ l ssDNS (10 mg/ml), 2 μ l plazmid DNS (100-200 ng), 100 μ l LiAc

oldatban felvett *S. cerevisiae* sejt, 600 µl PEG oldat. Az elegyhez 70 µl DMSO-t adtunk és 15 perces hősokknak vetettük alá. A sejteket centrifugálással összegyűjtöttük és TE pufferben (70 µl) oldottuk fel, és SD-Ura szilárd táptalajra szélesztettük. A transzformált sejtek 2-3 napon keresztül 28 °C-on történő inkubáció után alkottak telepeket.

A vektor konstrukciók ellenőrzését DNS szekvenálással végeztük el. A szekvenálás során a klónozó primereken (4. táblázat) kívül az 5. táblázatban bemutatott primereket használtuk.

5. táblázat. DNS szekvenáláshoz használt primerek

Primer neve	Szekvencia, 5'-3'	Célszekvencia
CaHAL3L1	CAATATGTAACACGGGATCC	pGEX6p-1-CaHAL3
CaHAL3U1	GTCAGAAACCGTTCAAGAAG	pGEX6p-1-CaHAL3
CaHAL3U2	GAAGTACCAGATGAAGAAGA	spGEX6p-1-CaCAL3
CaCAB3L1607	TGTTTAGCGGTGATTGGATG	pGEX6p-1-CaCAB3
CaCAB3U600	GACCAATCATAGTCATGGCA	pGEX6p-1-CaCAB3
CaPPZ1 3L*	TAAAGCAGCACTATCTAAAGG	pGEX6p-1-CaPPZ1
CaPPZ1 5L*	GATGACTTGTGAGATGTTG	pGEX6p-1-CaPPZ1
CaPPZ1: 3U*	CAGCAACTTCAGAAAATCC	pGEX6p-1-CaPPZ1
pGEX-5'***	GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG	pGEX6p-1 plazmidok
PGEX- 3'***	CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG	pGEX6p-1 plazmidok

* Adam és mtsai. (2012) szerint. ** Az UD Genomed Ltd által biztosított primerek.

A DNS szekvenálást minden esetben az UD-GenoMed Medical Genomic Technologies Kft. végezte el a Sanger-féle lánctermináláson alapuló eljárással. Az eredményt DNA Baser szoftver segítségével értékeltünk ki.

5.2.5 Fehérjék izolálása és vizsgálata

5.2.5.1 Rekombináns fehérjék termeltetése

Rekombináns fehérjéket BL21 DE3 RIL *E. coli* sejtekben termeltettünk. Egyéjszakás transzformált baktérium tenyészetből 2-3 ml-t 500 ml LB tápvesbe tettünk, amelyet előzőleg kiegészítettünk a megfelelő antibiotikumokkal. pET28a plazmiddal transzformált sejteknél kanamycin (végkoncentráció: 50 µg/ml) és kloramfenikol (végkoncentráció: 34 µg/ml), míg pGEX-6P-1 vektor használata esetén ampicillin (végkoncentráció: 100 µg/ml) és kloramfenikol

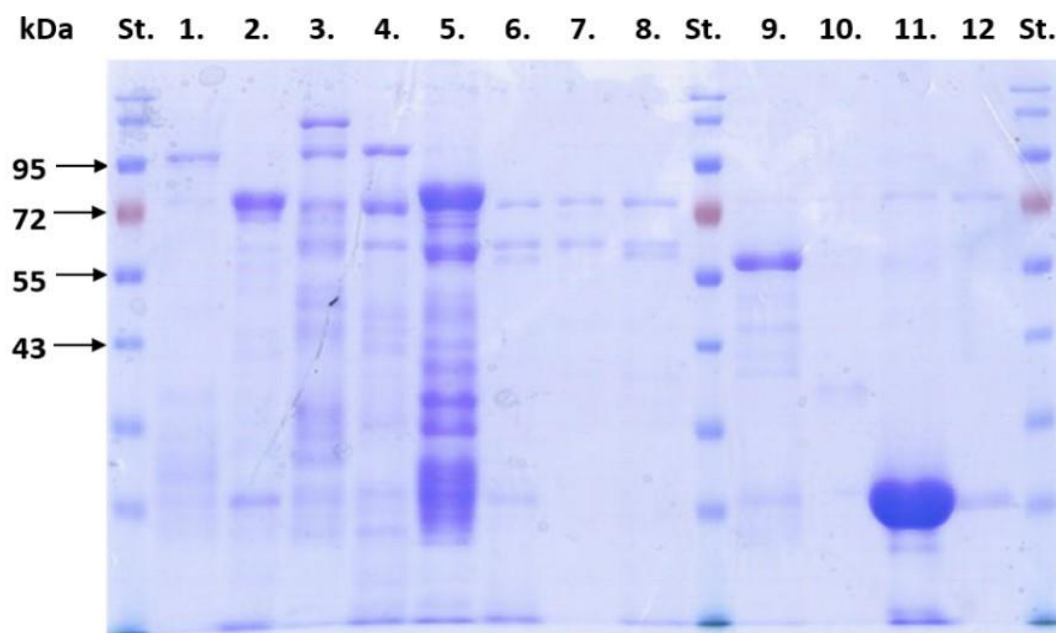
(végkoncentráció: 34µg/ml) antibiotikumokat adtunk a táptalajhoz. A CaPpz1 és CaPpz1-Cter expressziója során MnCl₂-dal (végkoncentráció: 0,5 mM) is kiegészítettük a táptalajt (Ádám és mtsai., 2012). A tenyészeteket OD₆₀₀= 0,6-0,8 közötti értékig növesztettük 37 °C-on 180 rpm rázatás mellett. A 6. táblázatban látható a fehérjék expressziója során használt optimális hőmérséklet, a termeltetés ideje és az indukcióhoz használt IPTG koncentráció. Az expresszió után a sejteket centrifugálással összegyűjtöttük, és -70 °C-on tároltuk.

6. táblázat. Fehérje expresszió körülményei

Rekombináns fehérje	Hőmérséklet (°C)	Indukció (óra)	IPTG (mM)	Hivatkozás
GST-CaHal3	25	3	0,6	saját eljárás
GST-CaCab3	37	3	0,5	saját eljárás
GST-ScPpz1	21	18	0,1	Ruiz és mtsai. (2004)
GST-ScPpz1-Cter	21	18	0,1	Ruiz és mtsai. (2004)
GST-CaPpz1	18	3	0,5	saját eljárás
GST-CaPpz1-Cter	18	18	0,5	saját eljárás
6xHis-CaPpz1	18	18	0,5	Ádám és mtsai. (2012)

5.2.5.2 GST-címkével ellátott fehérjék tisztítása affinitás kromatográfiával

A fehérje expresszió után összegyűjtött sejteket 10 ml lízis pufferben felszuszpendáltuk, és 4x1 perc szonikálással (Branson Sonifer) feltártuk. A feltárt sejteket centrifugáltuk, így elválasztottuk a sejtörmeléket a szolubilizált fehérjéktől. 300 µl Glutation Sepharose 4B (GE Healthcare) gyantát lízis pufferrel ekvilibráltunk, és hozzáadtuk a szonikálás utáni felülúszót. Az elegyet 2-3 órán keresztül 4 °C-on inkubáltuk, majd „batch” technikával mostuk úgy, hogy az elegyhez hozzáadtunk lízis puffert, összekevertük, és centrifugálással elválasztottuk a gyantát és a bakteriális fehérjéket tartalmazó lízis puffert. Ezzel a módszerrel 5-ször mostuk a gyantát lízis pufferrel és 3-szor Triton X-100 nélküli lízis pufferrel. Munkánk során vagy GST-címke nélküli tiszta fehérjére volt szükségünk, vagy a gyantához kötött tiszta rekombináns fehérjét használtuk. Az utóbbi esetben a tisztítás ezen pontjánál 300 µl eluáló pufferben fagyasztottuk le a gyantát. GST-címke nélküli tiszta fehérje előállítása érdekében a gyantához 300 µl eluáló puffert és 3µl PreScission proteázt (GE Healthcare) adtunk. Az elegyet 18 órán át inkubáltuk 4 °C-on. A lehasított fehérjét centrifugálással elválasztottuk a gyantától, amit 2x300 µl eluáló pufferrel mostunk (García-Gimeno és mtsai., 2003).



12. ábra. Tisztított fehérjék ellenőrzése SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel.

St. PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific) fehérje standard 1: GST-CaHal3 Glutathion Sepharose 4B gyantán, 2: CaHal3, 3: GST-CaCab3 Glutathion Sepharose 4B gyantán, 4: CaCab3, 5: GST-CaPpz1 Glutathion Sepharose 4B gyantán, 6: CaPpz1, 7: 6xHis-CaPpz1 Ni-NTA gyantán, 8: 6xHis-CaPpz1, 9: GST-CaPpz1-Cter Glutathion Sepharose 4B gyantán, 10: CaPpz1-Cter, 11: GST Glutathion Sepharose 4B gyantán, 12: GST

Minden tisztítási lépés során mintát vettünk, amelyet spatulahegynyi DTT-vel és 25 μ l SDS mintapufferrel 10 percig főztünk. A mintákat SDS-poliakrilamid gélen elválasztottuk (Laemmli, 1970), molekulaméret meghatározásához pedig PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific) standardot használtunk. Az eluátumok fehérje koncentrációját Bradford módszerrel határoztuk meg (Bradford, 1976). A tisztított fehérjék és a gyantán lévő fehérjék gélelektroforézis utáni képét a 12. ábra mutatja.

A SDS-PAGE elválasztás során eltért a fehérjék számított és mért mérete. A 7. táblázatban látható, hogy a Hal3 ortológok (CaHal3 és CaCab3) detektálható mérete minden esetben nagyobb volt a várt méretnél, ami azzal magyarázható, hogy a fehérjék rendezetlen szerkezetűek, így az elválasztás során nem a méretüknek megfelelően mozognak a gélben. Kis eltérés figyelhető meg a teljes hosszúságú CaPpz1 fehérje esetében is, hiszen az N-terminális domén rendezetlen szerkezetű, viszont a kizárólag C-terminálist tartalmazó csonkított fehérje a várt méretnél detektálható, ahogyan a kontrollként alkalmazott GST is. A fehérjepreparátumok tisztaságát minden esetben denzitometrálassal ellenőriztük. A preparátumok bakteriális fehérjéket és degradátumokat tartalmaztak, amelyek azonban a tervezett kísérleteket nem befolyásolták, tehát a preparátumok alkalmasak voltak a további vizsgálatokra.

7. táblázat. A vizsgált fehérjék SDS-PAGE elválasztás során várt és mért mérete

Minta száma (lásd 12. ábra)	Vizsgált fehérje	Számított méret (kDa)*	Detektálható méret (kDa)*
1.	GST-CaHal3 Glutation Sepharose 4B gyantán	85	96
2.	CaHal3	59	72
3.	GST-CaCab3 Glutation Sepharose 4B gyantán	106	129
4.	CaCab3	80	100
5.	GST-CaPpz1 Glutation Sepharose 4B gyantán	80	76
6.	CaPpz1	54	59
7.	6xHis-CaPpz1 Ni-NTA gyantán	54	59
8.	6xHis-CaPpz1	54	59
9.	GST-CaPpz1-Cter Glutation Sepharose 4B gyantán	62	55
10.	CaPpz1-Cter	36	36
11.	GST Glutation Sepharose 4B gyantán	26	29
12.	GST	26	29

* A számított és mért molekula méretek között jelentős különbséget mutató preparátumokat vastag betűvel emeltük ki

5.2.5.3 6xHis címkével ellátott fehérje tisztítása affinitás kromatográfiával

Munkánk során a CaPpz1 fehérje volt az egyedüli, amelynek expressziójához a pET28a vektort használtuk (Ádám és mtsai., 2012). Az expresszió után összegyűjtött sejteket 10 ml lízis pufferben felszuszpendáltuk, és 3x1 perces szonikálással feltártuk. Centrifugálással elválasztottuk a sejtörmeléket, az oldható fehérjéktől. A szolubilizált fehérjéket tartalmazó szonikálás utáni felülúszót 1 ml Ni-NTA gyantával 1 órán keresztül állandó keverés mellett 4 °C-on inkubáltuk, így kikötöttük a 6xHis-CaPpz1 fehérjét. A felülúszó-gyanta keveréket oszlopra vittük fel, és először 10 ml mosó I. oldattal, majd 10 ml mosó II. oldattal távolítottuk el a bakteriális fehérjéket. A 6xHis-CaPpz1 fehérjét 5x1 ml eluáló pufferrel eluáltuk. Minden eluált frakció fehérje koncentrációját megmértük Bradford módszerrel (Bradford, 1976). A tisztítási lépések után minden esetben 25 µl mintát vettünk, és spatulahegynyit DTT-vel és 25

µl 2xSDS mintapufferrel 10 percig főztük. A mintákat SDS-poliakrilamid gélen elválasztottuk (Laemmli, 1970) PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific) standard jelenlétében. Az így tisztított fehérje vizsgálatának eredményét a 12. ábrán látható 7. és 8. sáv mutatja. Ni-agaróz gyantán a 6xHis-CaPpz1 és a szabad 6xHis-CaPpz1 várt mérete 54 kDa volt, ezzel szemben 59 kDa méretnél detektáltuk a fehérjét. A különbséget a fehérje N-terminális doménjének rendezetlen szerkezete okozza, ami megváltoztatja a fehérje vándorlási sebességét a gélben. A fehérjepreparátum tisztaságát denzitometrálassal ellenőriztük, és megállapítottuk, hogy alkalmas a további kísérletekre.

5.2.5.4 Western blot

A fehérje mintát SDS-poliakrilamid gélen elválasztottuk (Laemmli, 1970), majd nitrocellulóz (GE Healthcare) membránra blottoltuk. A membrán szabad kötőhelyeit 5% tejport tartalmazó TBST oldattal blokkoltuk. A kísérletek során használt antitestek adatai a 8. táblázatban találhatók. A vizsgálni kívánt fehérje elleni antitesttel a membránt egy éjszakán át inkubáltuk. A nem specifikusan kötődő elsődleges antitestet háromszor TBST-vel mosva távolítottuk el, majd torna peroxidázzal konjugált másodlagos antitesttel inkubáltuk a membránt egy órán át. Ezután a membránt minden esetben háromszor mostuk TBST oldattal, majd egyszer TBS oldattal és végül a jelzett sávot ECL reagenssel hívtuk elő. Az antitesteket minden esetben 5%-os tejport tartalmazó TBST-ben hígítottuk a 8. táblázatban leírtak szerint.

8. táblázat Western blot kísérletek során használt antitestek

Antitest neve	Forrás	Katalógusszám	Hígítás
Anti-HA antitest	Invitrogen	71-5500	1000 x
Anti-His-antitest	Qiagen	34660	1000 x
Anti-rabbit-antitest	Sigma-Aldrich	A0545-1ML	5000 x
Anti-mouse-antitest	Sigma-Aldrich	A9044-2ML	3000 x

5.2.6 Fehérje-fehérje kölcsönhatások kimutatása

Munkánk során „pull down” módszerrel két elrendezésben detektáltuk a fehérje-fehérje interakciót. Az első módszer során tisztított fehérjéket használtunk, a második kísérletben pedig, HA-címkével ellátott fehérjéket expresszázó *S. cerevisiae* kivonattal dolgoztunk.

5.2.6.1 „Pull down” baktériumban expresszált tisztított rekombináns fehérjékkel

A kísérlet során tisztított, GST-címkével ellátott CaPpz1-Cter fehérjét tartalmazó Glutation Sepharose 4B gyantát használtunk. 25 µl GST-CaPpz1-Cter gyantához, 75 µl üres Glutation Sepharose 4B gyantát adtunk. A gyantával folyamatos forgatás mellett 25 °C-on 40 percig inkubáltuk a tisztított CaHal3, CaCab3 és ScHal3 rekombináns fehérjéket. A reakcióelegyet négyszer 200 µl eluáló pufferrel mostuk, majd az 100 µl gyantát eluáló pufferben felvettünk, és pipettahegynyi DTT-vel és 25 µl 5xSDS mintapufferrel 10 percig főztük. A gyantáról lemosott fehérjéket 10%-os SDS-poliakrilamid gélen elválasztottuk (Laemmli, 1970). A molekulaméret meghatározásához minden esetben PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific) standardot használtunk. A gélét Coomassie Brilliant Blue (Sigma-Aldrich) festékkel festettük meg.

Reverz „pull down” során a lehetséges gátló fehérjéket kötöttük Glutation Sepharose 4B gyantához. Negatív kontrollként GST-t tartalmazó gyantát alkalmaztunk. A gyantát 6xHis címkével ellátott CaPpz1 fehérjével inkubáltuk, majd mostuk az előzőekben leírt módon. A gyantához kötött fehérjéket SDS-poliakrilamid gélben elválasztottuk (Laemmli, 1970) PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific) standard mellett, majd Hybond ECL membránra (GE Healthcare) transzferáltuk a fehérjéket. A membránt 5%-os tejport tartalmazó TBST oldattal blokkoltuk, majd 5% tejport tartalmazó TBST-ben oldott anti-His antitesttel inkubáltuk 18 órán át. Háromszori TBST-vel való mosás után a membránt 5% tejport tartalmazó TBST-ben oldott, peroxidázzal konjugált anti-mouse antitesttel inkubáltuk 1 órán át. Az ECL reagenssel (ThermoScientific) adott reakciót röntgenfilmen (Kodak) detektáltuk.

5.2.6.2 „Pull down” élesztőben expresszált rekombináns fehérjékkel

A transzformált *ppz1* deléciós mutáns *S. cerevisiae* sejtekben HA-címkével jelzett potenciális kölcsönható fehérjéket termeltettünk (Abrie és mtsai., 2012). A transzformált élesztősejtek egyéjszakás tenyészetéből 2-3 ml-t 50 ml SD-Ura táptalajban növesztettünk tovább 8 órán keresztül 28 °C-on, 180 rpm rázatás mellett. A sejteket centrifugálással összegyűjtöttük, és 800 µl lízis pufferben felfuszpendáltuk. A sejtszuszpenziót 300 µl üveggyöngyöt tartalmazó mikrocentrifugacsőbe tettük, és 3x1 percig vortexeltük, közben 2-2 percig jégen tartottuk. A sejttörmelékét centrifugálással üleptítettük, és a felülúszóban maradt fehérjekivonatot vizsgáltuk tovább. A fehérje koncentrációt Bradford módszerrel határoztuk meg (Bradford, 1976). Az expresszió sikerességét Western blottal ellenőriztük (lásd 21. ábra az Eredmények fejezetben).

A fehérje-fehérje interakció kimutatásához olyan „pull down” kísérletet végeztünk, ahol a GST-címkés CaPpz1 fehérjét Glutation Sepharose 4B gyantához kapcsoltuk, és a megfelelő

fehérjét expresszázó élesztősejtek kivonatával inkubáltuk. 50 µl tisztított GST-fúziós CaPpz1 fehérjét tartalmazó Glutathion Sepharose 4B gyantával inkubáltunk 150 µg élesztő fehérje extraktumot 1,5 órán át 4°C-on állandó keverés mellett. Az elegyet az élesztő fehérje extraktum készítése során használt lízis pufferrel mostuk négy alkalommal. A gyantát 100 µl lízis pufferben vettük fel, és kristálynyi DTT-vel, valamint 25 µl 5xSDS mintapufferrel 10 percig főztük. A gyantához kötődött fehérjéket elúció után SDS gélelektroforézissel elválasztottuk (Laemmli, 1970) PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific) standard mellett. A fehérjéket Hybond ECL membránra (GE Healthcare) transzferáltuk és 5% tejport tartalmazó TBST oldattal blokkoltuk, majd 5% tejport tartalmazó TBST-ben oldott 1/1000 anti-HA elleni antitesttel inkubáltuk egy éjszakán át. 1xTBST oldattal mostuk háromszor a membránt, majd 5% tejport tartalmazó TBST-ben oldott 1/3000 peroxidáz konjugált anti-rabbit antitesttel inkubáltuk 1 órán át (Abrie és mtsai., 2012). A peroxidázzal konjugált antitest és az ECL reagens közti fotokémiai reakciót röntgenfilmmel (Kodak) detektáltuk.

5.2.7 Protein foszfatáz aktivitás mérés

A protein foszfatáz aktivitás mérésére ^{32}P jelöléssel ellátott miozin-könnyűlánc (^{32}P -MLC) szubsztrátot használtunk (Erdődi és mtsai., 1995). A mérések során CaPpz1, CaPpz1-Cter, ScPpz1 és ScPpz1-Cter rekombináns enzimek foszfatáz aktivitását 2 mM MnCl_2 jelenlétében határoztuk meg 1 µM ^{32}P -MLC szubsztráttal, a lehetséges gátlók jelenlétében és hiányában. A 30 µl reakcióközeg a következő komponenseket tartalmazta: 10 µl tisztított rekombináns foszfatáz enzim TM pufferben hígítva, 10 µl tisztított rekombináns Hal3 ortológ fehérje TM pufferben hígítva, vagy TM puffer, 10 µl ^{32}P -MLC szubsztrát. A foszfatáz aktivitás kontroll kísérleteként üres pGEX-6p-1 vagy pET28a plazmidról expresszáldott és affinitás kromatográfiával tisztított fehérjét használtunk. A reakcióközeget 10 percig 30°C-on inkubáltuk, majd 200 µl 10%-os TCA és 200 µl 6 mg/ml BSA segédfehérje hozzáadásával állítottuk le. A kicsapódott fehérjét centrifugálással üleptítettük le. A felülúszó radioaktivitását Cserenkov sugárzás alapján határoztuk meg Perkin Elmer TriCarb 2800TR készülékben. Minden esetben mértünk totál radioaktivitást (a szubsztrát radioaktivitása) és vak értékeket (háttér radioaktivitás). A cpm-ben (beütésszám egy perc alatt) mérhető radioaktivitásból számoltuk az MLC20 szubsztrátról lehasított foszfát mennyiségét. A specifikus aktivitást U/mg-ban számoltuk, amely megadja, hogy 1 mg enzim hány µmol szubsztrátot alakít át percenként.

6. Eredmények

6.1 A *CaPPZ1* gén szerepe a hifaképzésben

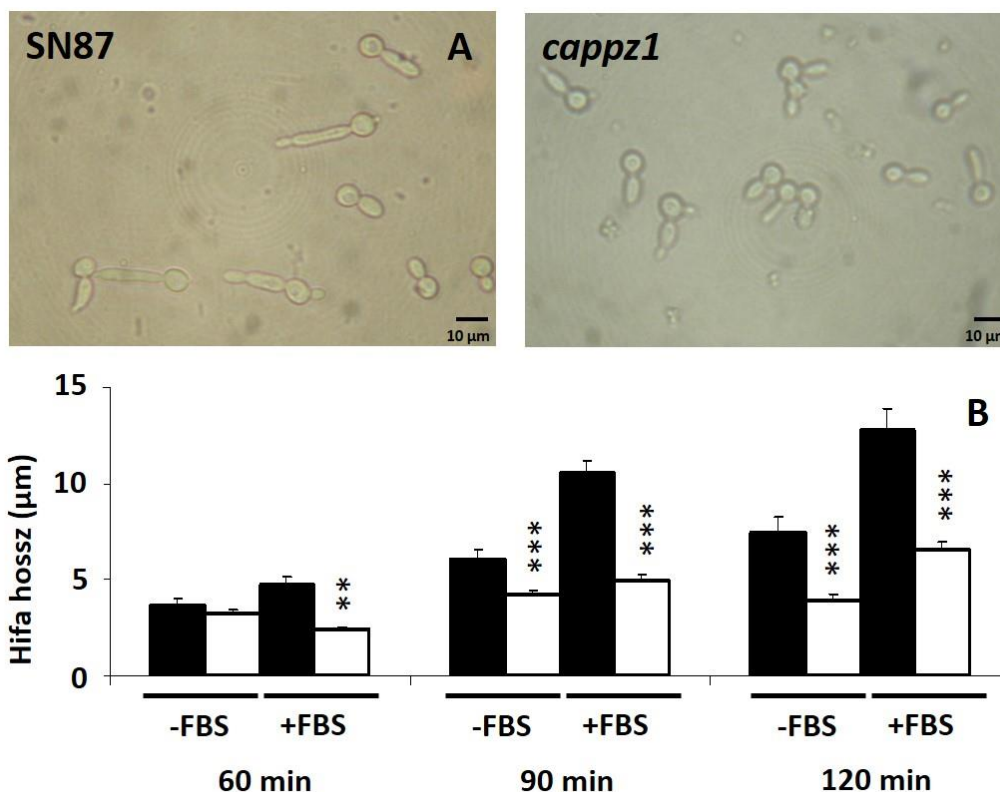
Számos kutatás foglalkozik azzal, hogy a mutációk vagy kémiai anyagok hatása milyen morfológiai változásokat okoz a sejtek életében. A morfológiai változások megfigyelése *C. albicans*-ban azért is nagy jelentőségű, mert a hifaképzése elősegíti a mycosist (Sudbery és mtsai., 2004), ezért lényeges megfigyelni, hogy mely gének és milyen behatások serkentik, illetve gátolják a hifaképzést.

Munkánk során célunk volt a *CaPPZ1* gén hiányában bekövetkező morfológiai változások megfigyelése. A sejtek morfológiai változásának megfigyelését előkísérletekben hagyományos mikroszkópiával, míg a fő kísérletben videomikroszkópos módszer segítségével végeztük el.

Előkísérletek során a *cappz1* deléciós törzset az eredeti anyai törzzsel hasonlítottuk össze. Az SN87 törzset tekintettük anyai törzsnek, hiszen ezt a törzset használtuk a deléciós mutáns létrehozásakor. Az SN87 törzs (2. táblázat) *HIS1* és *LEU2* gén hiányában hisztidin és leucin auxotrófiát mutatott. A *cappz1* deléciós mutáns létrehozásakor *HIS1* és *LEU2* marker géneket inzertáltunk a *CaPPZ1* gén két alléljának helyére. Tehát az anyai törzs (SN87) és a homozigóta *cappz1* mutáns közötti genetikai különbség nem csupán a *CaPPZ1* gént, hanem a *HIS1* és *LEU2* géneket is érintette. Ezért az előkísérletek során felhasználtuk a heterozigóta mutáns törzseket is, amelyekbe vagy a *HIS1* vagy a *LEU2* marker gén helyére visszajuttattuk a *CaPPZ1* gén egy-egy allélját (2. táblázat). Ezekkel a törzsekkel kívántuk kizárni azt a lehetőséget, hogy a fenotípusos változásokat a marker gének okozzák.

Az előkísérletek és a fő kísérlet nemcsak a használt törzsekben tért el, hanem a módszer kivitelezésén is. Az előkísérlet során a megfigyelés adott időpontokban vett minták mikroszkópos vizsgálatán alapult. Az SN87 kontroll és a deléciós mutáns törzsek tenyésztése során 60, 90 és 120 perc elteltével vettünk mintát. A klasszikus mikroszkópiával vizsgált morfológiai munka eredményét 13. ábra mutatja be. A 120 percig 5% FBS-t tartalmazó táptalajban végzett tenyésztés után vett mintákból mikroszkóp alatt felvételeket készítettünk (13.A ábra), majd a fotókat Image J program segítségével kiértékeljük. A 13.A ábrarészen bemutatott reprezentatív mikroszkópos képen látható, hogy a kontroll törzs hosszabb hifákat képez azonos idő alatt, mint az a törzs, amelyből a *CaPPZ1* gén hiányzik. A mintákban található sejtek hifahosszát lemértük, és az eredmények statisztikai értékelését az 13.B ábrán foglaltuk össze. A kísérletet FBS jelenlétében és hiányában is elvégeztük. Az 13.B ábrarészen jól látható, hogy 5% FBS elősegítette a hifaképzést, és a *cappz1* hiánymutáns a kontroll törzshöz képes

mind FBS jelenlétében, mind pedig hiányában szignifikánsan rövidebb hifát képzett a vizsgálat teljes időtartama alatt.



13. ábra. Az SN87 és *cappz1* törzsek hifa növekedésének összehasonlító vizsgálata. 13.A reprezentatív mikroszkópos felvétel az SN87 és *cappz1* mutáns törzs hifa növekedését mutatja 120 perc tenyésztés után. 13.B Az ábra 5% FBS jelenlétében és hiányában képződött hifák hosszát mutatja 60, 90 és 120 perc elteltével. A fekete oszlopok az SN87 törzs hifaképzését, a fehér oszlopok pedig a *cappz1* mutáns törzs hifaképzését ábrázolják. Az ábra 50 mérés átlagát és szórását mutatja, a szignifikancia a T-teszt analízis eredménye (**, $p < 0.005$; ***, $p < 0.0005$).

A 9. táblázatban látható, hogy FBS jelenlétében a vizsgált törzsek 30, 60 és 90 perc elteltével milyen hosszú hifát képeztek. A vizsgálat során a *cappz1* hiánymutáns és a hozzá tartozó kontroll törzsön kívül két heterozigóta törzset is vizsgáltunk, amelyek különböző marker gének mellett a *CaPPZ1* gén egy-egy allélját tartalmazzák. Azt találtuk, hogy a homozigóta mutáns törzs hifaképzése szignifikánsan lassabb a kontroll törzséhez viszonyítva. A heterozigóta törzsek (*CaPPZ1*-LEU2 és *CaPPZ1*-HIS1) hifaképzése a kontroll törzsével megegyező, amely szerint nem valószínű, hogy az egyik vagy a másik marker gén önmagában befolyásolná a hifa növekedését.

9. táblázat. Hifa növekedés vizsgálata heterozigóta és homozigóta *cappz1* mutáns törzsekben és az SN87 anyai törzsben.

	Idő		
Törzs	30 perc	60 perc	90 perc
SN87	23,5 ± 3,1	63,3 ± 4,4	96,1 ± 3,2
<i>cappz1</i>	6,0 ± 2,1***	42,6 ± 3,6**	95,7 ± 2,5
<i>CaPPZ1-LEU2</i>	25,6 ± 6,2	64,0 ± 2,1	97,9 ± 1,2
<i>CaPPZ1-HIS1</i>	23,8 ± 5,4	59,2 ± 5,6	97,2 ± 1,7

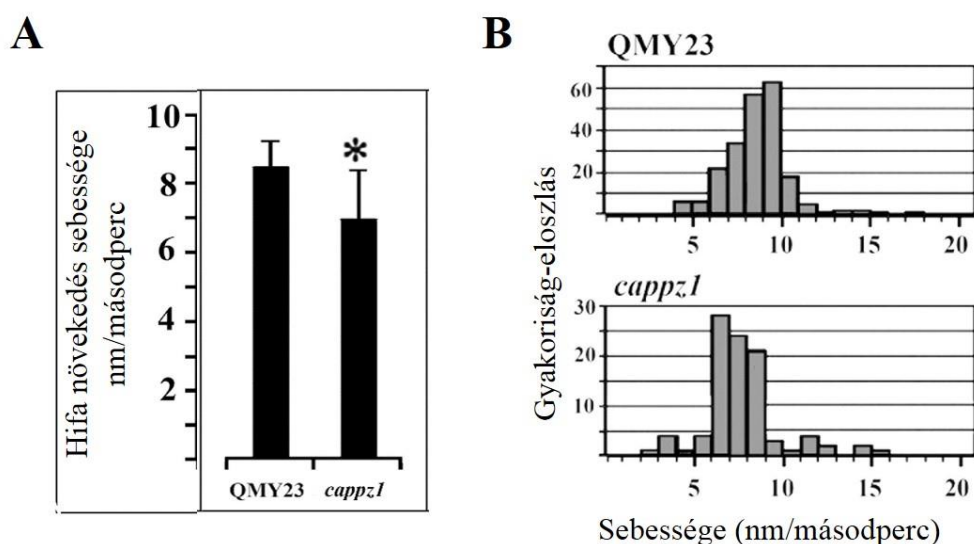
A táblázat az 5% FBS jelenlétében képződött hifák hosszát mutatja µm-ben megadva, 60, 90 és 120 perc elteltével. A táblázat három független kísérlet során végzett 50-50 mérés átlagát és szórását tartalmazza.

Ezen kezdeti eredményekből arra következtethetünk, hogy a *CaPpz1* géntermék közvetlen vagy közvetett módon, de hatással van a *C. albicans* sejtek hifa képzésére.

A munkánk későbbi fázisában az SN87 törzs helyett a QMY23 törzset használtuk, amelynek a teljes genetikai háttere megegyezik a *cappz1* deléciós törzsével (kivéve a *CaPPZ1* gén delécióját, lásd 2. táblázat). A genetikai szempontból tökéletesen összevethető törzsek használata mellett a *C. albicans* sejtek morfológiai változásának megfigyelésére egy új módszert adaptáltunk, amellyel a fiziológiához közeli állapotban folyamatosan tudtuk a sejteket megfigyelni. Az előbbieken leírt előkísérletektől való lényeges eltérés az, hogy a sejteket nem kell a vizsgálathoz a tenyésztő közegből kimozdítani. A videomikroszkópos módszer során az inkubátorban történik a fotódokumentáció, ahol mikroszkópokhoz csatlakoztatott kamerák segítségével felvételt készítünk a sejtekről. Az így készített képekből time-lapse video készíthető, amit mozgás analizáló programmal értékeltünk ki. Informatikai elemzéssel a sejtek hifanövekedésén kívül a sejtek letapadásáról is információt kaphatunk. Az informatikai kiértékelést Dr. Nagy Gábor és Grant Hennig, Ph.D. végezte.

Ezen általunk bevezetett vizsgálati rendszer a valósághoz közeli képet mutat a sejtek változásáról, hiszen nem éri őket külső behatás a megfigyelés alatt. Az összehasonlítás korrektebb, mert az összehasonlító mérések egymással párhuzamosan, azonos körülmények között zajlanak, és az események kvázi folyamatos követése révén több információt kapunk, ami segít abban, hogy jobban megértsük a sejtek válaszát a vizsgált mutációra.

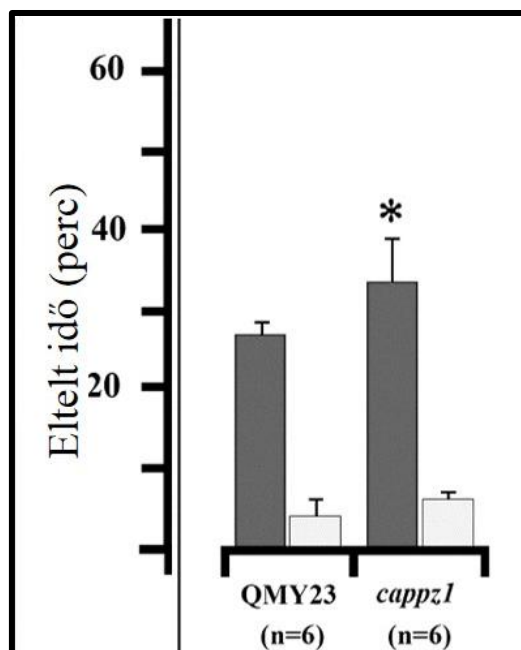
Videomikroszkópos módszerrel vizsgáltuk a *cappz1* deléciós törzset a hozzá tartozó kontroll törzzsel (QMY23) összevetve. A videomikroszkópos vizsgálat eredménye megerősítette, hogy a *cappz1* deléciós mutáns hifanövekedésének sebessége szignifikánsan elmarad a kontroll törzshez képest (14.A ábra). A 14.B ábrán látható, hogy a *CaPPZ1* gén deléciója miatt a hifaképzés gyakoriság-eloszlása a kisebb sebességek irányába tolódik el és nem követi a normál eloszlást.



14. ábra. Hifa növekedés sebességének videomikroszkópos vizsgálata. 14.A ábra. A *cappz1* deléció hatása a hifanövekedés sebességére a hozzá tartozó kontroll törzshöz (QMY23) képest. Az ábrán három mérés átlaga látható, a szignifikanciát t teszttel számoltuk, * $p < 0.05$. 14.B ábra A hifa növekedés sebességének eloszlása a *cappz1* mutáns és kontroll törzs esetében. 3 párhuzamos mérés átlagát ábrázoltuk.

A videomikroszkópos megfigyelés során olyan plusz információkat tudunk meg a sejtekről, mely a sejtek adhéziójáról adnak felvilágosítást.

A 15. ábrán látható sötétszürke oszlopok azt jelzik, mennyi idő szükséges a *cappz1* deléciós mutánsnak és a kontroll törzsnek az adhézióhoz. A *CaPPZ1* gént nem tartalmazó törzsnek a kontroll törzshöz képest szignifikánsan több időre volt szüksége, hogy letapadjon. A fehér oszlopokkal a sejtek adhézió utáni hifaképzéséhez szükséges időt ábrázoltuk. A két vizsgált törzs esetében az eltérés nem volt szignifikáns.



15. ábra. A sejtek letapadásához és a hifa kinövéséhez szükséges idő a sejtek ülepedése után. A sejteknek a tenyésztőedény felszínéhez való letapadásához szükséges idejét sötétszürke oszlopok jelölik. A fehér oszlopok a hifaképzés megkezdéséhez szükséges időt mutatják a sejtek letapadását követően. A *cappz1* deléciónak hatását a megfelelő genetikai háttérű kontrollhoz viszonyítottuk.

Tehát eredményeinket összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a *cappz1* deléciós törzs hifaképzésének sebessége lassabb a kontroll törzshöz képest, és a mutáns adhéziónak képessége is jelentősen elmarad. Ezen morfológiai különbségek összhangba hozhatók azzal a megfigyeléssel, hogy a *CaPPZ1* gén terméke, a CaPpz1 fehérje szerepet játszhat a *C. albicans* virulenciájában (Ádám és mtsai., 2012).

6.2 Protein foszfatáz Z inhibitorok vizsgálata *C. albicans*-ban

A CaPpz1 fehérje funkciójáról már elég részletes információink vannak, az enzim szabályozása viszont még nem ismert *C. albicans*-ban. *S. cerevisiae*-ben írták le először a Hal3 fehérjét, mint Ppz gátlót (de Nadal és mtsai., 1998). Az adatbázisok elemzésével *C. albicans*-ban két Hal3 ortológot találtunk. Munkánk további részében ezen Hal3 ortológok funkcióját, esetleges regulátor szerepét vizsgáltuk.

6.2.1 Lehetséges protein foszfatáz Z inhibitorok azonosítása a *C. albicans* genomban

Az irodalmi bevezetőben összegyűjtöttem mindazt, amit eddig a Hal3 fehérjéről tudunk. Viszont szeretném kiemelni, miért különleges a Hal3 fehérje. A *S. cerevisiae*-ben található Hal3 fehérjét több oldalról megvizsgálták és számos publikáció foglalkozik a fehérje funkciójával, hiszen ebben a törzsben három Hal3 homológ található (Hal3, Vhs3 és Cab3), amelyek együttesen heterotrimert képeznek és részt vesznek a CoA bioszintézisben, foszforantimonil-cisztein dekarboxiláz (PPCDC) aktivitásuk révén. Két Hal3 homológ, a Hal3 és Vhs3 moonlighting fehérje, tehát a CoA bioszintézisben betöltött szerepén kívül rendelkezik Ppz gátló funkcióval. Eddig ez az első olyan fehérje, amelyről ismert, hogy szerepet játszik a gombaszpecifikus protein foszfatáz Z regulációjában. Munkánk során ezért vizsgáltuk a *C. albicans*-ban található Hal3 ortológok funkcióját.

C. albicans-ban két Hal3 ortológ található, amelyeket szekvenciaanalízis után CaHal3-ként (orf19.7378) és CaCab3-ként (orf19.3260) neveztünk el. A részletes szekvenciaanalízis és a családfa elemzés a 3. fejezetben található. Az összehasonlítás során a szekvenciákon kívül a moonlighting fehérjék különböző funkciójában szerepet játszó aminosavak és szekvencia szakaszok összehasonlítása is fontos volt. A CaHal3 (orf19.7378) szekvenciája nagy azonosságot mutat az ScHal3 fehérjével és a PPCDC alegységben fontos szerepet játszó hisztidin aminosavat is tartalmazza, viszont a PPZ1 gátlás során nagy valószínűséggel fontos aminosav szekvencia nem található benne. A CaCab3 (orf19.3260) fehérje szekvenciája nagy azonosságot mutat az ScCab3 fehérjével, és a PPCDC trimer kialakulása során esszenciális hisztidin és cisztein aminosavakat is tartalmazza, viszont egy nem-homológ szekvencia szakasz is megtalálható benne, amely az ScHal3 fehérje Ppz regulációjában szerepet játszó szakasszal

azonosítható. A családfa analízissel a CaHal3 fehérje a Hal3 fehérjékhez csoportosítható, míg a CaCab3 fehérje a Cab3 fehérjékkel mutat nagyobb rokonságot.

Ezen szekvencia elemzések azt mutatták, hogy a CaHal3 fehérje kisebb eltéréssel a Hal3 fehérjékhez tartozik és a CaCab3 fehérje kisebb eltéréssel a Cab3 fehérjékhez tartozik. Így a kezdeti hipotézisünk az volt, hogy a CaHal3 funkciója az ScHal3-éhoz hasonló, a CaCab3 pedig az ScCab3-hoz hasonló fiziológiás szerepet tölt be.

Munkánk során az előbb említett két gén terméke volt vizsgálataink célpontja. A következő kérdésekre kerestünk választ: van-e szerepük a CoA bioszintézisben? Hozzákötődnek-e a ScHal3 ortológok a CaPpz1 fehérjéhez, ha pedig hozzákötődnek, képesek-e a CaPpz1 foszfatáz aktivitását gátolni? Milyen fenotípusos választ váltanak ki a sejtben, és ez összefüggésbe hozható-e a CaPpz1 fehérjével? Azaz a ScHal3 homológok *S. cerevisiae*-ben leírt „moonlighting” funkciója megőrződött-e az evolúció során?

6.2.2 CaHal3 és CaCab3 fehérjék CoA bioszintézisben betöltött szerepének vizsgálata

Munkánk során vizsgáltuk, hogy a CaHal3 és CaCab3 fehérjéknek van-e szerepe a CoA bioszintézisben. A részletes szekvencia analízis és a családfaanalízis is azt mutatja, hogy a CaHal3 nagy azonosságot mutat az ScHal3 fehérjével, a CaCab3 az ScCab3 fehérjével mutat nagy azonosságot, és az ScCab3 fehérjében megtalálható PPCDC aktivitáshoz esszenciális aminosavakat, motívumokat tartalmazza. A fentiek alapján feltételeztük, hogy ezen fehérjék PPCDC aktivitásban játszott szerepe konzerválódott.

Ezért molekuláris genetikai módszerrel kísérletesen vizsgáltuk a CaCab3 és CaHal3 fehérjék CoA bioszintézisben betöltött szerepét. Ennek érdekében *S. cerevisiae* heterozigóta *cab3* deléciós (MAR25), illetve *hal3/vhs3* kettős heterozigóta deléciós törzsekben (AGS4) expresszáltuk a Hal3 ortológokat (pWS93 plazmid segítségével), majd a tetrád analízis során a haploidok életképességét vizsgáltuk. A *cab3* heterozigóta mutáns spóraképzése során négy spórából két spóra tartalmazta *ScCAB3* gént, így két spóra volt életképes, míg a deléciót tartalmazó két spóra életképtelen volt. Ha ebben a törzsben olyan fehérjét termeltettünk, amely képes komplementálni az ScCab3 hiányát, akkor mind a négy spóra életképes volt.

A *vhs3/hal3* heterozigóta mutánsokkal végzett kísérlet során a tetrádok genotípusát további szelektáló lemezekben való növesztéssel határoztuk meg.

Az *ScHAL3* gén egyik allélját *LEU2* gént tartalmazó kazettával ültették ki, míg a *ScVHS3* gént kanamycin rezisztenciát okozó kazettával deletálták (3. táblázat), így a leucin auxotrófia hiánya és a kanamycin rezisztencia segítettek a haploidok pontos genotípusának

meghatározásában. A további genotípus meghatározásra azért volt szükség, mert a Cab3 fehérje képes aktív heterotrimer létrehozására csak ScHal3 vagy ScVhs3 fehérjével is. Tehát kerestük azon felnőtt telepeket, amelyek sem az *ScHAL3*, sem az *ScVHS3* gént nem tartalmazták, mégis életképesek voltak. Így a felnőtt telepekből egy-egy pipettahegnyit további szelektáló tápagra kentünk. A leucinmentes tápagon felnőtt telepek a *VHS3* gént tartalmazták, a kanamycint tartalmazó tápagon felnőtt telepekben *HAL3* gén volt, azon telepek, amelyek leucinmentes, kanamycintartalmú tápagon is felnőttek, *hal3/vhs3* mutánsok voltak, és ezekben a sejtekben menekítette a letális fenotípust az overexpresszált fehérje. Vizsgálataink azt mutatták, hogy a CaHal3 fehérje képes menekíteni a letális fenotípust a *hal3/vhs3* heterozigóta mutáns törzsben, ezzel szemben az ScCab3 fehérjének nincs hatása.

10. táblázat. PPCDC funkció vizsgálata tetrad analízissel

	Plazmidok				
Törzsek	pWS93	ScHal3	ScCab3	CaHal3	CaCab3
<i>cab3</i>	- (9)	- (9)	+ (9)	- (9)	+ (9)
<i>hal3/vhs3</i>	- (19)	+ (17)	- (12)	+ (35)	- (24)

Üres pWS93 plazmida, illetve *ScHAL3*, *ScCAB3*, *CaHAL3* és *CaCAB3* teljes leolvasási keretét tartalmazó pWS93 plazmida transzformáltunk *S. cerevisiae* heterozigóta mutáns *cab3* és *hal3/vhs3* sejteket. Ezen sejtekkel elvégzett tetrad analízist eredményét mutatja a 10. táblázat -: a plazmidról expresszált fehérje nem képes a letális fenotípus menekítésére. +: a plazmidról expresszált fehérjemenekítette a letális fenotípust. Zárójelben a vizsgált tetradok mennyisége látható.

A 10. táblázatban látható, hogy a *cab3* heterozigóta deléciós törzsben a letális fenotípust az ScCab3 fehérjén kívül a CaCab3 fehérje is tudta menekíteni. A *hal3/vhs3* heterozigóta deléciós törzsben az ScHal3 fehérjén kívül a CaHal3 fehérje is menekíteni tudta a letális fenotípust. Tehát a CaCab3 fehérje az ScCab3 hiányát, míg a CaHal3 fehérje az ScHal3 fehérje hiányát volt képes komplementálni. Ebből arra következtettünk, hogy a CaCab3 az ScCab3-mal megegyező feladatot lát el, és hasonlóképpen, a CaHal3 az ScHal3-mal megegyező funkcióval rendelkezik az életfontosságú CoA bioszintézisben.

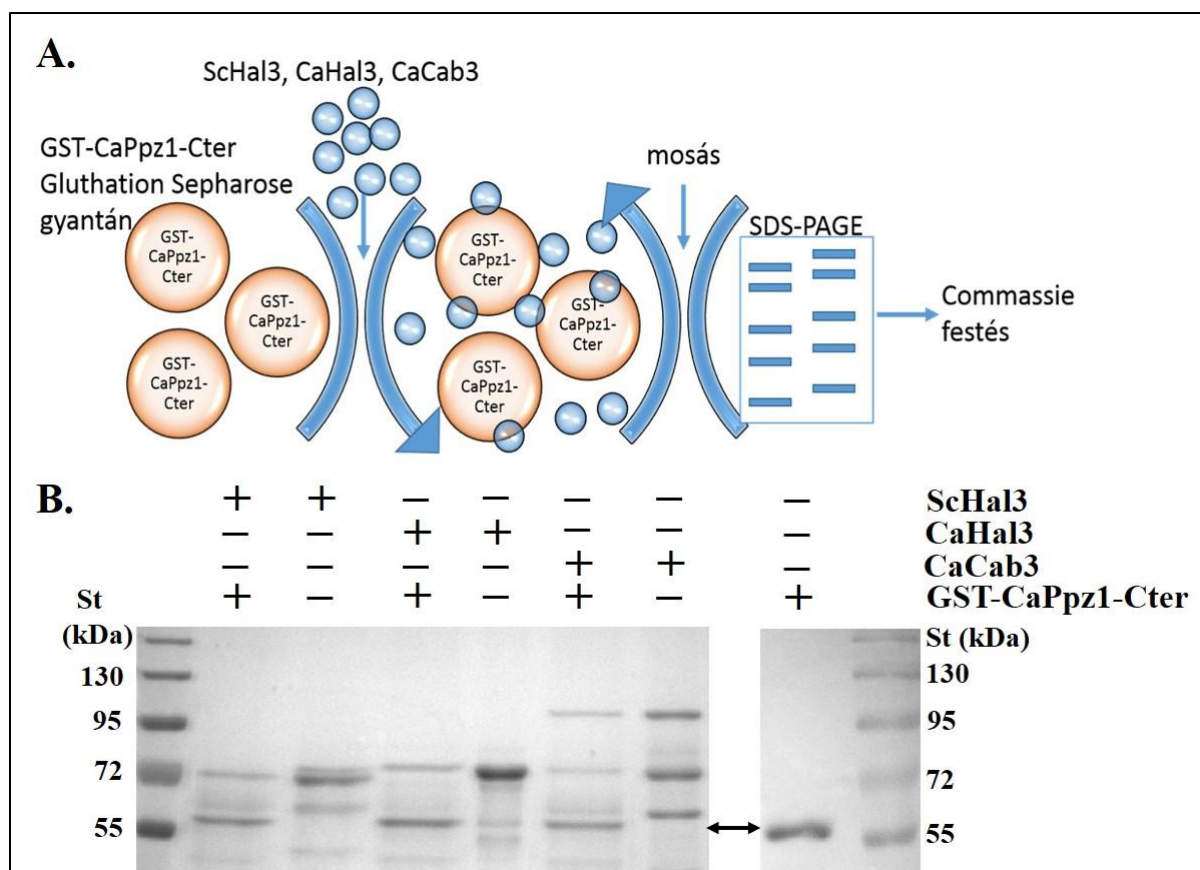
6.2.3 A *C. albicans* Hal3 ortológ fehérjéinek szerepe a CaPpz1 regulációjában

S. cerevisiae-ben a ScHal3 és ScVhs3 fehérjék rendelkeznek ScPpz gátló funkcióval. A Ruiz és munkatársai által 2009-ben publikált eredményekből tudjuk, hogy a ScHal3 és ScVhs3

mellett a ScCab3 is képes kötődni a fehérjéhez, viszont a foszfatáz aktivitását nem tudja gátolni. Így a munkánk során vizsgált CaHal3 és CaCab3 fehérjéről feltételeztük, hogy mindkét fehérje képes kötődni a CaPpz1 fehérjéhez, de foszfatáz aktivitását csak a CaHal3 fehérje tudja gátolni. Feltételezésünk ellenőrzésére *in vitro* fehérje kölcsönhatási tesztek és foszfatáz aktivitás méréseket végeztünk, majd megvizsgáltuk a CaHal3 és CaCab3 fehérjék CaPpz1 foszfatázzal összefüggésbe hozható funkcióit *in vivo* körülmények között.

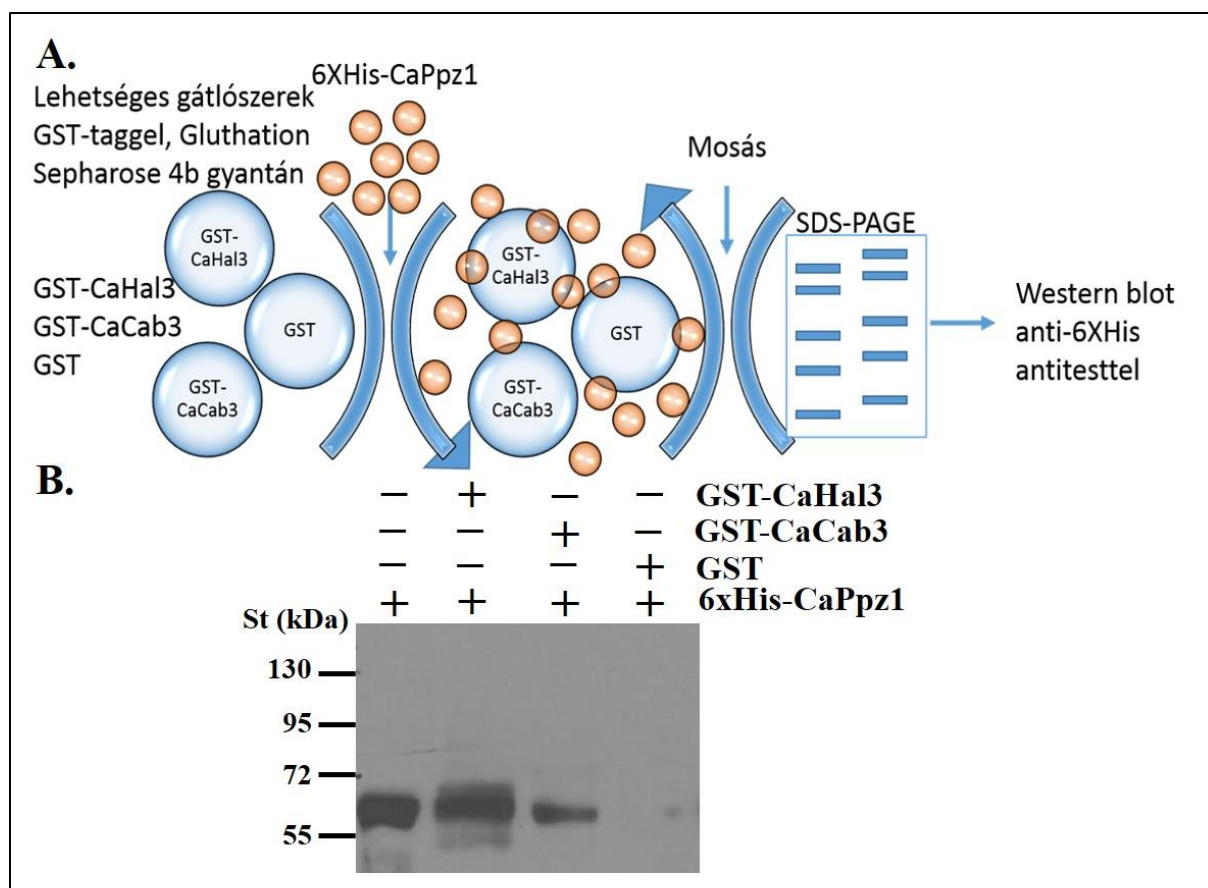
6.2.3.1 A Hal3 ortológok és a Ppz1 fehérje közötti interakció kimutatása pull down módszerrel

A fehérje-fehérje kölcsönhatások vizsgálatához először baktériumban expresszált és affinitás kromatográfiával tisztított fehérjéket használtunk. A Glutathion Sepharose 4B gyantához GST-címkével kikötött CaPpz1 C-terminális katalitikus doménnel inkubáltuk a tisztított rekombináns Hal3 homológokat, a CaHal3, CaCab3 és ScHal3 fehérjéket. A gyantát ezután többször mostuk, hogy az aspecifikus kötődés lehetőségét kizárjuk. A CaPpz1 katalitikus doménjét és a hozzá kötődött fehérjéket poliakrilamid gélen méret szerint elválasztottuk, és Coomassie Brilliant Blue festékkel megfestettük (5.2.6.1. fejezetben leírtak szerint). A kísérlet lépéseit a 16.A sematikus ábra foglalja össze, a Coomassie Brilliant Blue-val megfestett gélkép pedig a 16.B ábrán látható. A gélképen a molekulatömeg standard után a gyantáról eluált fehérjék és kontrollként a felvitt fehérjék mennyisége látható. Kontroll kísérletben az ScHal3 fehérjével inkubáltuk a GST-CaPpz1-Cter fehérjét tartalmazó gyantát, és a 62 kDa méretű GST-fúziós foszfatáz domén mellett a gélképen látható a 72 kDa méretű ScHal3 fehérje is. További kísérleteink szerint mind a CaHal3, mind pedig a CaCab3 fehérjék kölcsönhatásba léptek a foszfatáz katalitikus doménjével, ugyanis az eluált mintában a 62 kDa méretű GST-fúziós foszfatáz domén mellett látható a 72 kDa méretű CaHal3, és detektálható a 85 kDa méretű CaCab3 (16.B ábra). Mindhárom pozitív reakció azt bizonyítja, hogy a CaPpz1 katalitikus doménjéhez a lehetséges gátló fehérjék erősen kötődnek, hiszen egy nem túl érzékeny fehérjefestési eljárással is könnyen detektálhatók voltak.



16. ábra. CaHal3 és CaCab3 fehérjék kölcsönhatása a CaPpz1-C-terminális doménnel. (16.A) Glutathion Sepharose 4B gyantához kötött GST-CaPpz1-Cter fehérjét inkubáltunk a tisztított Hal3 ortológokkal. A gyantához kötődött fehérjéket SDS-poliakrilamid gélen elválasztottuk és Coomassie Brilliant Blue gélfestéssel megfestettük. (16.B) A gélképen látható, hogy mind a CaHal3 és a CaCab3, mind pedig az ScHal3 fehérje erősen kötődött a CaPpz1 katalitikus doménjéhez, amely már Coomassie festéssel detektálható volt. St: molekulatömeg standard, a molekulaméreteket kDa-ban adtuk meg. A kettős nyíl a CaPpz1-Cter fehérjét jelöli.

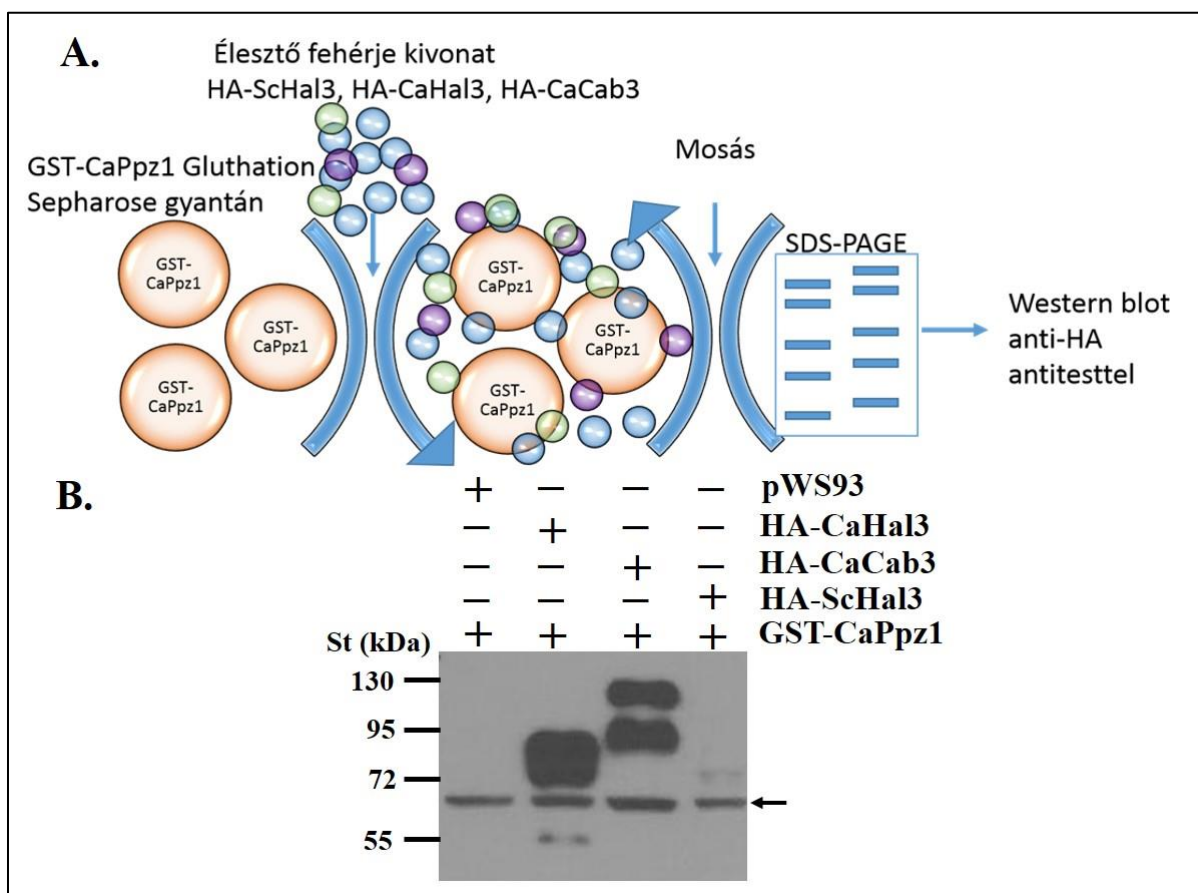
Miután pull down módszerrel detektáltuk, hogy a CaPpz1-Cter fehérjéhez az ScHal3 fehérjén kívül a CaHal3 és a CaCab3 fehérje is kötődik, további vizsgálatainkat a teljes hosszúságú CaPpz1 fehérjével folytattuk. Azonban miután a 16. ábrán bemutatott kísérletet elvégeztük a teljes hosszúságú CaPpz1 fehérjével is, a kis érzékenységű Coomassie Brilliant Blue festéssel egyik lehetséges gátló fehérje interakcióját sem tudtuk detektálni. A vizsgálatot megismételtük egy érzékenyebb festési eljárással is, de azt tapasztaltuk, hogy a CaPpz1 és a lehetséges gátlófehérjék közötti kölcsönhatást még ezüsfestéssel sem lehetett kimutatni. Ezért további vizsgálataink során a fehérje-fehérje kölcsönhatást a még érzékenyebb Western blot technikával kívántuk detektálni.



17. ábra. CaHal3 és CaCab3 fehérjék kölcsönhatása a teljes hosszúságú CaPpz1 fehérjével. (17.A) Glutathion Sepharose 4B gyantához kötött, tisztított GST-CaHal3 és GST-CaCab3 fehérjéket inkubáltunk 6xHis-CaPpz1 fehérjével. Kontroll kísérletként Glutathion Sepharose 4B gyantához kötött GST-t használtunk. A gyantához kötött fehérjéket SDS-poliakrilamid gélen elválasztottuk, és Western blot technikával, anti-His antitesttel detektáltuk a 6xHis-CaPpz1 fehérjét. (17.B) A kontroll kísérlet igazolta, hogy a 6xHis-CaPpz1 fehérje kimutatható volt anti-6xHis antitesttel. A gyantához kötött tisztított Hal3 ortológokhoz olyan mennyiségű 6xHis-CaPpz1 fehérje kötődött, amely már detektálható volt Western blot technikával. A negatív kontrollként alkalmazott, GST fehérjét tartalmazó gyanta nem kötött értékelhető mennyiségű CaPpz1 fehérjét.

Az előzőekben leírt pull down kísérlet stratégiáját úgy módosítottuk, hogy a lehetséges gátló fehérjéket kötöttük Glutathion Sepharose 4B gyantához, és ezekkel a gyantákkal inkubáltuk a 6xHis-címkés CaPpz1 fehérjét (17.A ábra). A mosási lépések után méret szerint elválasztottuk a gyantáról eluált fehérjéket, és Western blot technikával, anti-His antitesttel detektáltuk a 6xHis-CaPpz1 fehérjét. Az 55 kDa méretű 6xHis-CaPpz1 fehérje mind a CaHal3, mind pedig a CaCab3 fehérjéhez kötődött (17.B ábra). A kontroll kísérletben glutation-S-transzferázt kötöttünk Glutathion Sepharose 4B gyantához majd 6xHis-CaPpz1-gyel inkubáltuk. A gyantáról eluált oldatban nem tudtuk CaPpz1 fehérjét kimutatni, tehát a foszfatáz nem a gyantához vagy a címkéhez, hanem a gyantán lévő rekombináns fehérjékhez kötődött.

A fenti kísérlet alátámasztására reverz pull down kísérletet végeztünk úgy, hogy ezúttal a gyantához *E. coli*-ban expresszált és tisztított GST-CaPpz1 fehérjét kötöttünk, és élesztőben (*ppz* deléciós *S. cerevisiae* mutánsban) túltermeltetett, HA-címkével ellátott Hal3 ortológokkal inkubáltuk. Az expresszió hatékonyságát a 21. ábra igazolja. A kísérlet lépéseit a 18.A ábra mutatja be. Ebben az elrendezésben a Glutation Sepharose 4B gyantához tisztított rekombináns GST-CaPpz1 fehérjét kötöttünk, amelyhez hozzáadtuk a Hal3 ortológokat tartalmazó élesztőkivonatokat és inkubáltuk az elegyet. Mosás után a gyantáról eluált oldatban Western blot módszerrel, anti-HA antitesttel detektáltuk a Hal3 ortológokat.



18. ábra. Reverz pull down kísérlet a CaHal3, illetve CaCab3 és a teljes hosszúságú CaPpz1 fehérje kölcsönhatásának megerősítésére (18.A) *S. cerevisiae ppz1* deléciós mutáns élesztőben overexpresszáltunk HA-címkés Hal3 ortológokat. Ezen élesztőkből készített fehérjekivonattal inkubáltuk a tisztított GST-CaPpz1 fehérjét tartalmazó Glutation Sepharose 4B gyantát. A gyantához kötődött fehérjéket SDS-poliakrilamid gélen elválasztottuk, és Western blot technikával, anti-HA antitesttel detektáltuk a Hal3 ortológ fehérjéket. (18.B) A CaPpz1 fehérjével kölcsönhatásba lépett a CaHal3 és a CaCab3 fehérje, míg a pozitív kontroll kísérletben az ScHal3 fehérjével csak gyenge kölcsönhatás volt kimutatható. A negatív kontrollként alkalmazott üres pWS93 plazmid esetében nem volt kimutatható kölcsönhatás. Az anti-HA antitest minden mintában azonos erősségű aspecifikus jelet adott, amelyet nyíllal jelöltünk.

A reverz pull down kísérlettel sikerült megerősíteni a CaPpz1 teljes hosszúságú fehérje és a Hal3 ortológok közötti interakciót. A vizsgálat eredményét a 18.B ábrarész mutatja be. A GST-CaPpz1 fehérjéhez kapcsolódott a 72 kDa mérettel detektálható HA-CaHal3, és a 85 kDa-os HA-CaCab3. A HA-ScHal3 fehérjével nagyon gyenge kölcsönhatás volt kimutatható. A kontroll kísérlethez Hal3 ortológot nem expresszáló (üres pWS93 plazmiddal transzformált) élesztőkivonatot használtunk, amellyel nem volt kimutatható kölcsönhatás. Az anti-HA antitest minden mintában azonos erősségű aspecifikus jelet adott 63 kDa méretnél.

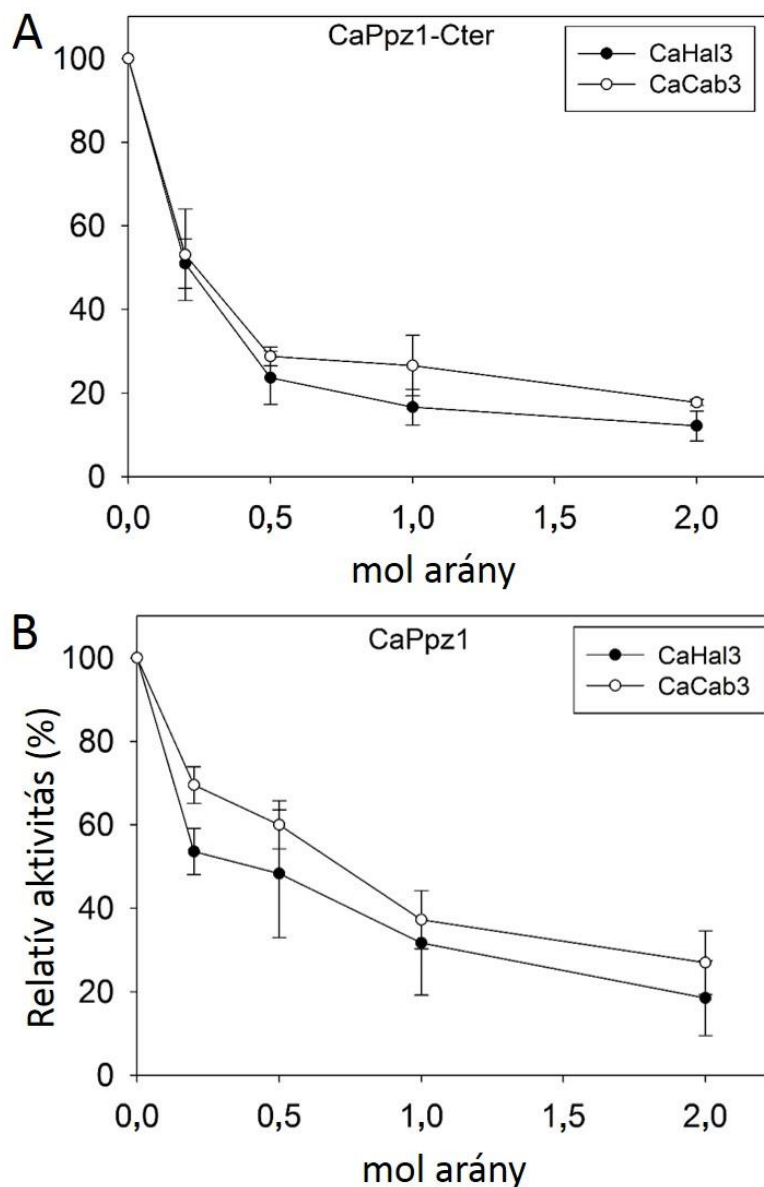
A pull down kísérletek eredményeként elmondhatjuk, hogy a CaPpz1 fehérje katalitikus doménjéhez és a teljes hosszúságú fehérjéhez is kötődik mind a CaHal3, mind pedig a CaCab3 fehérje. Ezek az eredmények alátámasztják kezdeti hipotézisünket. Mivel mindkét fehérje kötődött a CaPpz1 fehérjéhez, további vizsgálataink során arra kerestük a választ, hogy a CaHal3 és CaCab3 fehérjék gátolják-e a CaPpz1 foszfatáz aktivitását.

6.2.3.2 Hal3 ortológok hatása a CaPpz1 *in vitro* foszfatáz aktivitására

Az irodalmi bevezetésben látható 5. ábra szerint a CaHal3 nagy hasonlóságot mutat a *S. cerevisiae*-ben leírt ScHal3 fehérjével, amelyről már tudjuk, hogy protein foszfatáz Z reguláló hatása van. Ezzel szemben a CaCab3 az ScCab3 fehérjével mutat nagy hasonlóságot, amelynek nincs szerepe a Ppz szabályozásában. Így következő munkahipotézisünk az volt, hogy csak a CaHal3 fehérje fogja gátolni a CaPpz1 foszfatáz aktivitását. A kérdés megválaszolása érdekében *in vitro* foszfatáz aktivitás vizsgálatokat terveztünk.

Az *in vitro* foszfatáz aktivitásmérés során pulyka zúzából tisztított miozin könnyűlánc (MLC20) szubsztrátot használtunk, amely ^{32}P izotóppal volt jelölve (^{32}P -MLC20). A korábban alkalmazott p-nitrofenil-foszfáttal történő mérés alacsony érzékenysége miatt adaptáltuk a radioaktívan jelzett MLC20 szubsztráttal történő foszfatáz aktivitás mérést protein foszfatáz Z-re. Az általunk bevezetett radioaktív mérés 20-szor érzékenyebb detektálást biztosított.

A 19. ábra mutatja be a foszfatáz aktivitás vizsgálatokat. A kísérletek során megvizsgáltuk a tisztított rekombináns CaPpz1-Cter katalitikus domén és a teljes hosszúságú CaPpz1 fehérje foszfatáz aktivitását önmagában, illetve CaHal3 és CaCab3 fehérjék jelenlétében. A rekombináns fehérjéket tisztított formában növekvő koncentrációban adtuk hozzá a foszfatáz formákhoz.



19. ábra. CaHal3 és CaCab3 hatása a CaPpz1 katalitikus domén és a teljes hosszúságú CaPpz1 *in vitro* foszfatáz aktivitására. CaPpz1-Cter (19.A) és a teljes hosszúságú CaPpz1 (19.B) fehérjék az ^{32}P -MLC20 szubsztrátot defoszforilálták, ezt az alap foszfatáz aktivitást 100%-nak tekintettük. A diagramon a növekvő koncentrációban hozzáadott CaHal3 (●) és CaCab3 (○) fehérjék hatása látható. Az ábra három-három párhuzamos mérés átlagát és szórását mutatja.

A 19.A ábrán látható, hogy a CaPpz1-Cter fehérje defoszforilálta a ^{32}P -MLC20 szubsztrátot. A foszfatáz specifikus aktivitása 1220 mU/mg volt. A 19.B ábrarész azt mutatja, hogy a teljes hosszúságú CaPpz1 fehérje is képes defoszforilálni az ^{32}P -MLC20 szubsztrátot, azonban az enzim specifikus aktivitása csak 4,636 mU/mg volt. Tehát a teljes hosszúságú CaPpz1 fehérje foszfatáz aktivitása alacsonyabb, mint az N-terminális szakaszt nem tartalmazó

katalitikus doméné. Ebből arra következtetünk, hogy az N-terminális befolyásolja a foszfatáz aktivitását.

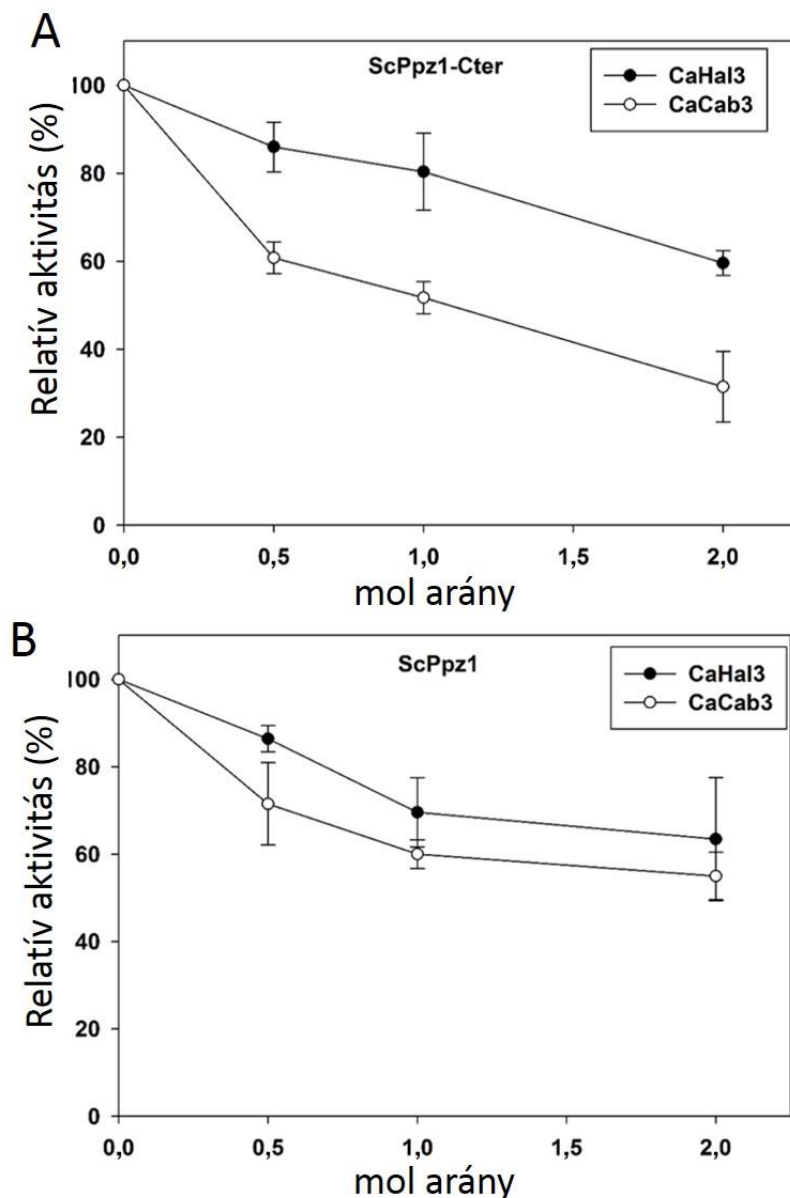
A 19. ábrán látható, hogy a CaPpz1-Cter és CaPpz1 fehérjék foszfatáz aktivitást mind a CaHal3, mind pedig a CaCab3 fehérjék koncentrációfüggő módon gátolják. Tehát eredményeink szerint a CaHal3 és a CaCab3 egyaránt kötődik a CaPpz1 fehérjéhez, és részt vesz a foszfatáz aktivitás regulációjában is *in vitro* körülmények között.

A CaPpz1-Cter domén fél-maximális gátlásához kisebb koncentráció is elég volt a Hal3 homológokból, mint a teljes hosszúságú fehérje esetében. Ebből arra következtetünk, hogy az N-terminális rendezetlen szerkezetű domén védő funkciót láthat el.

Mivel a CaCab3 gátló hatása nem állt összhangban az *S. cerevisiae* ortológgal kapott eredményekkel (Ruiz és mtsai., 2009), megvizsgáltuk, hogy a *Candida albicans* Hal3 paralógok hogyan hatnak az ScPpz1 aktivitására (20. ábra).

Az *in vitro* foszfatáz aktivitásmérés kivitelezése megegyezett a CaPpz1 fehérjével végzett vizsgálattal. A teljes hosszúságú ScPpz1 és a katalitikus domént tartalmazó fehérje, az ScPpz1-Cter is képes volt defoszforilálni az MLC20 szubsztrátot. A fehérjék specifikus aktivitása hasonló volt a *C. albicans* fehérjékéhez, ugyanis a katalitikus domén (ScPpz1-Cter) foszfatáz aktivitása magasabb volt (783,3 mU/mg), mint a teljes hosszúságú fehérje aktivitása (43,7 mU/mg). Eredményeink szerint tehát mind a *C. albicans*-ban, mind pedig az *S. cerevisiae*-ben a protein foszfatáz Z C-terminális katalitikus doménje magasabb foszfatáz aktivitást mutat, mint a teljes hosszúságú fehérje. Ebből arra következtethetünk, hogy az N-terminális szakasznak hatása van mindkét enzim működésére, ami azért érdekes, mert a két fehérje N-terminális doménje nem konzerválódott, egymáshoz viszonyított azonosságuk ~17% (Chen és mtsai., 2016).

A 20. ábrán látható, hogy a CaPpz1 foszfatázhoz hasonlóan az ScPpz1 katalitikus doménjét és teljes hosszúságú formáját is koncentrációfüggő módon gátolta a CaHal3 és CaCab3. Tehát annak ellenére, hogy a CaCab3 fehérje szekvenciája és PPCDC aktivitásban betöltött szerepe nagyban hasonlít az ScCab3 fehérjéhez, a Ppz regulációjában betöltött szerepe az *in vitro* mérések szerint eltérő. A CaHal3 és CaCab3 funkciójának további vizsgálata érdekében *in vivo* kísérleteket terveztünk.



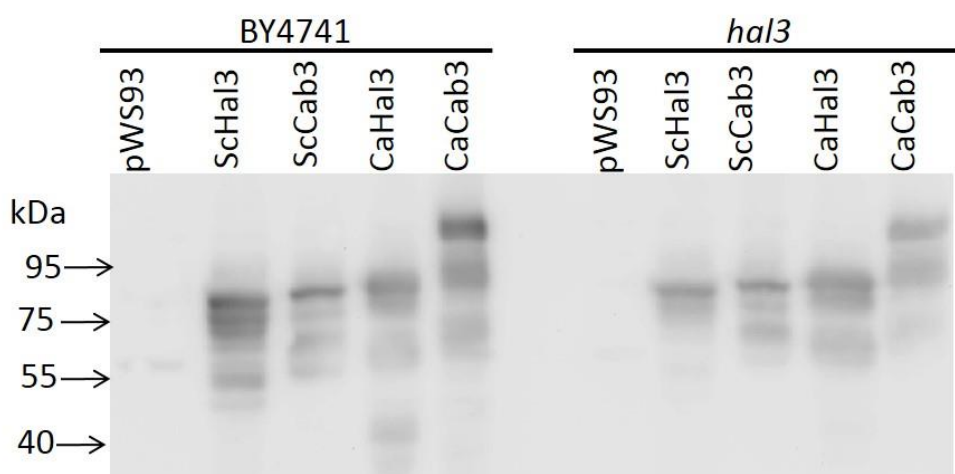
20. ábra. CaHal3 és CaCab3 fehérjék hatása az ScPpz1 foszfatáz aktivitására. Az ScPpz1-Cter katalitikus domén (20.A) és a teljes hosszúságú ScPpz1 (20.B) fehérjék az ^{32}P -MLC20 szubsztrátot defoszforilálták. Az ScPpz1 specifikus aktivitása 43,7 mU/mg, az ScPpz1-C-ter specifikus aktivitása pedig 783,3 mU. Ezt a foszfatáz aktivitást 100%-ként ábrázoltunk. A diagramon a növekvő koncentrációban hozzáadott CaHal3 (●) és CaCab3 (○) fehérjék hatása látható. Az ábra három-három párhuzamos mérés átlagát és szórását mutatja.

6.2.3.3 In vivo foszfatáz gátló funkciók vizsgálata *S. cerevisiae* modellben

Az *In vitro* foszfatáz pull down vizsgálatok és az aktivitásmérések azt mutatták, hogy a CaHal3 és CaCab3 fehérjék kötődnek a CaPpz1 teljes hosszúságú fehérjéhez és C-terminális katalitikus doménhez is, és foszfatáz aktivitásukat is gátolják. További kísérleteink során *in vivo* rendszerben vizsgáltuk a Hal3 ortológok foszfatáz regulációban betöltött szerepét. Ennek

érdekében *S. cerevisiae* modellrendszert használtunk, hiszen először ebben a fajban írták le a Hal3 homológokat, mint speciális Ppz regulátorokat, és a vizsgálatokhoz szükséges mutánsokat is ebben a gombában állították elő együttműködő partnereink.

C. albicans-ból származó Hal3 ortológokat pWS93 expressziós vektor segítségével expresszáltunk kontroll és *hal3* mutáns *S. cerevisiae* sejtekben. A pWS93 erős ADH1 promótere a HA-címkés fúziós fehérjék magas szintű konstitutív expresszióját tette lehetővé. A negatív kontroll kísérletben üres pWS93 plazmiddal transzformált sejteket használtunk, pozitív kontrollként pedig overexpresszáltuk a homológ ScHal3 és ScCab3 fehérjéket. Az expresszió mértékét Western blottal ellenőriztük (21. ábra).

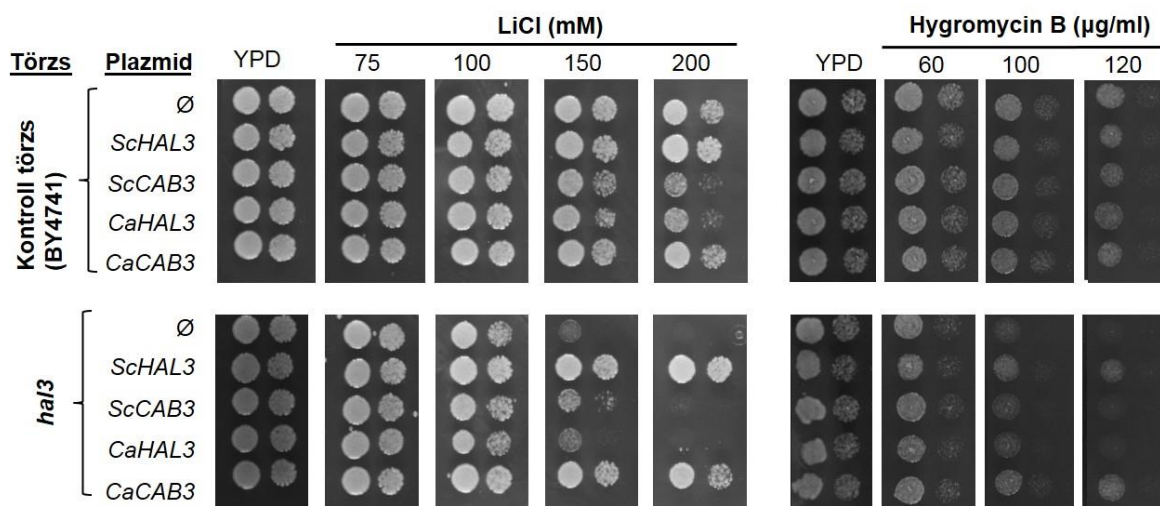


21. ábra. Hal3 ortológ fehérjék expressziója *S. cerevisiae* törzsekben. Üres pWS93 plazmiddal, illetve *S. cerevisiae* Hal3 és Cab3, *C. albicans* Hal3 és Cab3 teljes leolvasási keretét tartalmazó pWS93 plazmiddal transzformált *S. cerevisiae* sejtekből készített fehérje extraktumot SDS-poliakrilamid gélen elválasztottunk, és Western blot módszerrel, anti-HA antitesttel detektáltuk a termeltetett fehérjéket.

A különböző pWS93 plazmidokkal transzformált sejtekből fehérjekivonatot készítettünk és Western blot technikával, anti-HA antitesttel detektáltuk a pWS93 plazmidról expresszálódó rekombináns fehérjéket. A 21. ábrán látható, hogy az üres pWS93 plazmiddal transzformált sejtekből nem tudtunk HA-fúziós fehérjét detektálni, a többi esetben pedig megfelelő méretű rekombináns fehérjéket tudtunk kimutatni. Minden esetben megfigyeltük a rekombináns fehérjék degradálódását, ami azzal magyarázható, hogy mindegyik Hal3 ortológ tartalmaz proteáz érzékeny rendezetlen szerkezetű fehérje elemeket. Mivel a fehérjék közel hasonló mértékben expresszálódtak, a transzformált sejtek alkalmasak voltak az összehasonlító fenotípusos vizsgálatokhoz.

Az előbb jellemzett transzformált sejtek sóval és toxikus kationokkal szembeni toleranciáját vizsgáltuk. A 22. ábrán látható, hogy a különböző overexpresszált fehérjék hogyan

befolyásolták a kontroll (BY4741), illetve a *hal3* hiánymutáns sejtek LiCl-dal és Hygromycin B-vel szembeni toleranciáját. A növekedési teszt során az üres és a vizsgálni kívánt leolvasási kereteket tartalmazó expressziós vektorral transzformált élesztősejteket tenyésztettük stresszhatású anyagot növekvő koncentrációban tartalmazó szilárd tápagon.



22. ábra. CaHal3 és CaCab3 fehérjék túltermeltetésének hatása *S. cerevisiae* sejtekben. Kontroll törzsben és *hal3* deléciós mutánsban overexpresszált Hal3 ortológok hatása látható növekvő só stressz (LiCl) és toxikus kation (Hygromycin B) koncentráció mellett. A stresszhatású anyagot tartalmazó szilárd tápagra két koncentrációban ($OD_{620}=0,005$ és $0,0005$; minden szilárd tápagon először a töményebb, majd a 10x hígított transzformánsok láthatók) kicseppentett sejteket 48 óra inkubálás után fotóztuk le. A reprezentatív ábra két független transzformálás eredményét mutatja be.

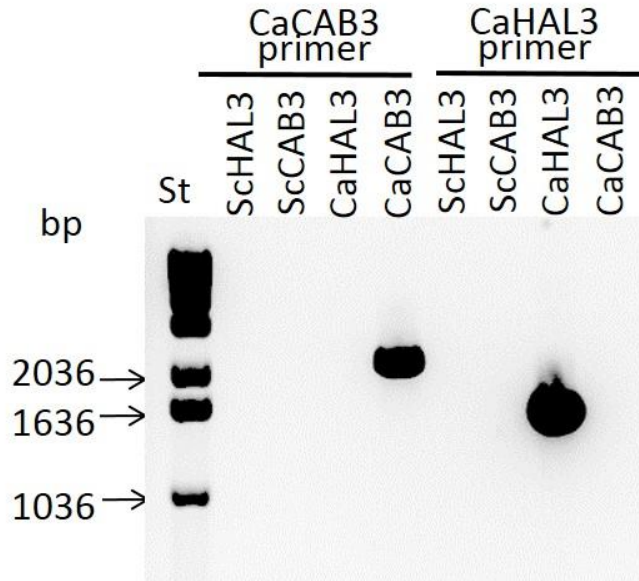
Irodalmi adatokból tudjuk, hogy az ScPpz1/2 szerepet játszik a Na^+ -ATP-áz, *ENA1* gén regulációjában (Posas és mtsai., 1995), ami *in vivo* vizsgálatok során abban nyilvánul meg, hogy az ScPpz1/2 hiánya nátriumion és lítiumion toleranciát okoz. Az ScHal3 overexpressziója is sótoleranciát (LiCl, NaCl) és toxikus kationokkal szembeni toleranciát eredményez (Ferrando és mtsai., 1995; de Nadal és mtsai., 1998). Ezzel szemben az ScCab3 fehérje overexpressziója inkább ellentétes, anti-Hal3 hatással van a nátriumion és lítiumion toleranciára (Ruiz és mtsai., 2009).

Yenush és munkatársai (2002-ben) írták le, hogy az ScHal3 overexpressziója hogyan befolyásolja a sejtek toxikus kationokra adott válaszát. Az ScHal3 overexpressziója toleránssá teszi a sejteket toxikus kationokkal szemben, amely megegyezik a *ppz1/2* deléciós sejtek toxikus kationokra adott válaszával. Az ScHal3 fehérjének nem csak a sótoleranciában, de a toxikus kationokkal szemben adott válaszában is a ScPpz1 fehérjével ellentétes a hatása, tehát *in vivo* kísérletek bizonyítják az ScHal3 ScPpz1 regulációban betöltött szerepét.

Az irodalmi adatokkal összhangban a *hal3* mutánsban a ScHal3 fehérje overexpressziója LiCl és Hygromycin B toleranciát okoz, ezzel szemben az ScCab3 fehérjének nincs hatása a stresszt okozó ágensekkel szemben, az üres plazmiddal transzformált sejtekhez hasonló növekedést mutatnak az ScCab3 fehérjét overexpresszáló sejtek.

A várakozásokkal ellentétben a CaHal3 túltermeltetése nem okozott LiCl és Hygromycin B toleranciát, ezzel szemben a CaCab3 overexpressziója mindkét stressz ágens jelenlétében toleránssá tette a sejteket. Tehát a CaCab3 overexpressziója képes komplementálni az ScHal3 hiányát.

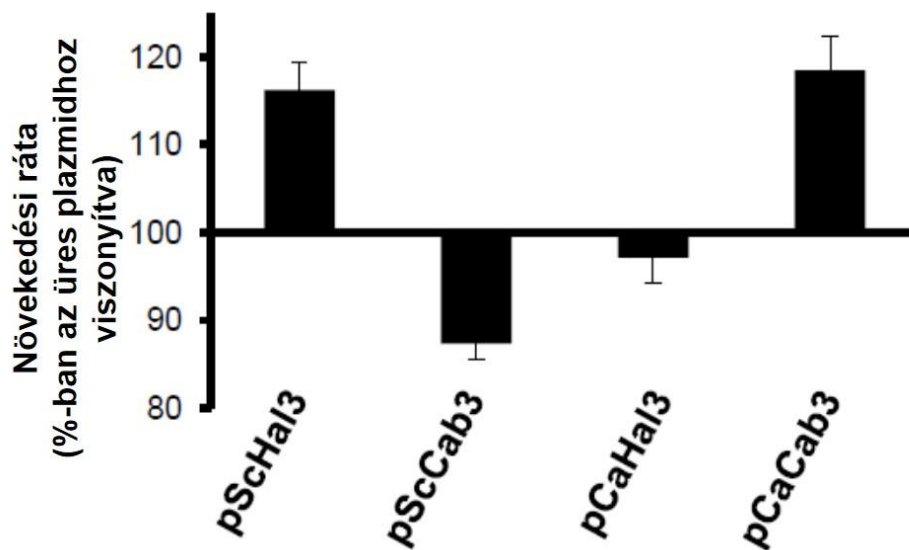
A növekedési teszt során a hipotézisünkkel ellentétes eredményeket kaptunk, miszerint nem a CaHal3, hanem a CaCab3 képes az ScHal3 hiányát komplementálni. A minták összekeverésének kizárása érdekében szükségesnek éreztük a kísérlet alátámasztását kolónia PCR-rel. A növekedési teszt után közvetlenül a szilárd tápagon felnőtt telepekből vett mintákkal kolónia PCR-t végeztünk a CaHal3 és CaCab3 fehérjéket kódoló plazmidok ellenőrzésére. A PCR során a *CaHAL3* szekvencia jelenlétét CaHal3EcoRI és CaHal3XhoI primerpárral ellenőriztük, a *CaCAB3* jelenlétét pedig CaCab3EcoRI és CaCab3XhoI primerpárral (4. táblázat). A PCR reakcióelegyekbe 1-1 pipettahegynyit tettünk a telepekből. A reakció elvégzése után agaróz gélelektroforézissel méret szerinti elválasztást végeztünk, melynek eredménye a 23. ábrán látható. pWS93 plazmid tartalmazta a különböző Hal3 ortológok szekvenciáját. A kolónia PCR során először *CaCAB3* szekvenciákra specifikus primerpárral végeztük el a kísérletet, így azt vártuk, hogy a *CaCAB3* primerpárral elvégzett reakció után csak a *pWS93-CaCAB3* plazmiddal transzformált sejteknél kapunk terméket. Majd elvégeztük a kísérletet a *CaHAL3* primerpárral és azt vártuk, hogy csak a *pWS93-CaHAL3* plazmiddal transzformált sejtekből tudjuk detektálni a *CaHAL3* gén jelenlétét.



23. ábra. Fenotípusos vizsgálat ellenőrzése kolónia PCR segítségével. Növekedési vizsgálat után a felnőtt telepekből kolónia PCR-t végeztünk *CaHAL3*-ra és *CaCAB3*-ra specifikus primerpárokkal. A telepekből egy pipettahegnyit közvetlenül a PCR reakcióelegyekbe tettünk, majd a PCR reakció után agaróz gélelektroforézissel detektáltuk a pWS93-*CaCAB3* plazmiddal transzformált sejtekből a *CaCAB3*, a pWS93-*CaHAL3* plazmiddal transzformált sejtekből pedig a *CaHAL3* szekvenciáját.

A 23. ábrán látható, hogy a várakozással összhangban, csak a *CaCab3* elnevezésű telepből (pWS93-*CaCAB3* plazmiddal transzformált sejtekből) lehetett kimutatni a *CaCAB3* szekvenciáját, ahogyan csak a *CaHal3* elnevezésű telepből (pWS93-*CaHAL3* plazmiddal transzformált sejtekből) lehetett kimutatni a *CaHAL3* szekvenciáját. Tehát a kísérletek azt bizonyítják, hogy a növekedési vizsgálatnál kapott nem várt eredményeket nem kivitelezési hiba, vagy egyszerű összecserélés okozta.

A nem várt eredményeket megerősítette egy független vizsgálat, a limitált káliumion koncentráció mellett mért sejtnövekedés is (24. ábra). Az irodalmi adatok szerint a *hal3* deléciós törzs megnövekedett kálium felvételét a *ScHal3* fehérje overexpressziója tudja helyreállítani, ezzel szemben az *ScCab3* fehérjének negatív hatása van. A negatív hatás azzal magyarázható, hogy az *ScCab3* képes kötödni az *ScPpz1* fehérjéhez, így verseng a *Vhs3* fehérjével, amely nem csak kötödni, hanem gátolni is tudja az *ScPpz1* fehérjét, így a kálium felvétel még erősebb az *ScCab3* overexpresszió során (Yenush és mtsai., 2002).



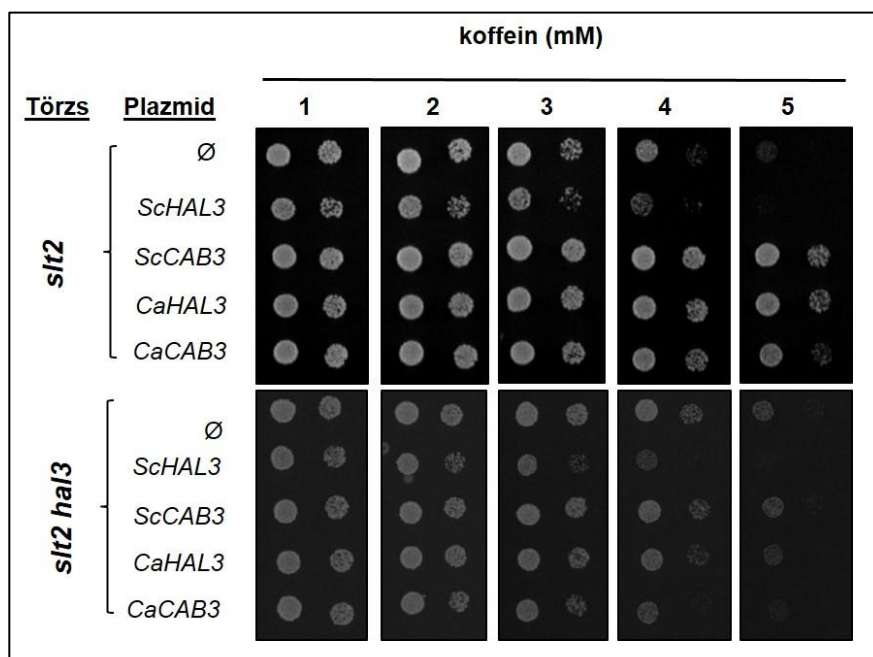
24. ábra. CaHal3 és CaCab3 növekedésre gyakorolt hatása limitáló kálium koncentráció mellett. *hal3* deléciós törzset transzformáltunk üres pWS93 plazmiddal és a Hal3 ortológok leolvasási keretét tartalmazó pWS93 plazmidokkal. A sejteket alacsony (1 mM) és magas (50 mM) KCl-ot tartalmazó közegekben tenyésztettük. 16 óra növekedés után sejtdenzitást mérünk és meghatároztuk az alacsony/magas káliumot tartalmazó közegben mérhető arányszámot. Az üres plazmiddal transzformált sejtekkel kapott adatot 100%-nak vettük. Az ábra 9 triplikátumban készített mérés átlagát és szórását mutatja be. (A kísérletet Cristina Molero végezte.)

A 24. ábrán látható, hogy az ScHal3 és a CaCab3 fehérjék túltermelése helyreállította a káliumfelvételt, így az élesztősejtek ellenálltak a magas kálium koncentrációnak, míg az ScCab3 és CaHal3 fehérjék overexpressziója negatívan hatott a sejtek növekedésére. Ezek az eredmények az előző vizsgálathoz hasonlóan az mutatják, hogy az ScHal3 és a CaCab3 overexpressziója olyan fenotípust mutat sóstressz hatására, mint a *cappz1* deléciós mutáns sejtek. Ez a független kísérleti megközelítés is alátámasztja, hogy *in vivo* körülmények között a ScHal3-hoz hasonlóan a CaCab3 részt vesz a Ppz1 regulációjában, ezzel szemben a CaHal3 hatástalan a sarjadzó élesztő sejtekben.

További vizsgálataink során olyan mutáns sejteket is vizsgáltunk, amelyekben a Ppz szerepének közvetett hatása figyelhető meg. Ismeretes, hogy az Slt2 kináz fontos szerepet játszik a sejtfalat érő stresszválaszban, és az *slt2* hiánymutáns lítikus fenotípust mutat. Az *slt2* hiánymutánsban a lítikus fenotípus erősödik, ha az *SLT2* hiánya mellett a *ScPPZ1* gén is hiányzik vagy ScHal3 fehérjét overexpresszálják. Ekkor még érzékenyebb a sejt a sejtfalkárosító ágensekkel, mint például a koffeinnel szemben (de Nadal és mtsai., 1998 és Posas és mtsai., 1993).

Ezért munkánk további részében a *C. albicans*-ban található Hal3 ortológok overexpresszójának hatását vizsgáltuk *slt2* mutáns sejtekben. A sótolerancia vizsgálatoknál kapott eredmények ismeretében azt vártuk, hogy a CaCab3 fehérje overexpressziója az ScHal3 fehérjéhez hasonlóan sejtfalkárosító anyaggal szembeni érzékenységet fog mutatni.

Vizsgálataink során *slt2* és *slt2/hal3* mutáns sejtekben is overexpresszáltuk a Hal3 ortológokat és koffeint tartalmazó tápagon végeztük a növekedési tesztet. A 25. ábra felső felén látható, hogy az *slt2* mutáns érzékeny a sejtfalkárosító szerrel szemben, ezt a lítikus fenotípust az ScHal3 overexpressziója erősíti, tehát a mutáns még érzékenyebb a sejtfal károsító koffein jelenlétére. Az ScCab3 fehérjének az *slt2* mutáns sejtekben tapasztalható anti-Hal3 hatását már korábbi vizsgálatok során tapasztalták. Az ScCab3 fehérjéhez hasonló anti-Hal3 hatást mutat a CaHal3 fehérje is. A CaCab3 fehérje az ScCab3 és CaHal3 fehérjéhez képest kis mértékben csökkent koffein toleranciát okoz.



25. ábra. CaHal3 és CaCab3 fehérjék hatása *slt2* és *slt2/hal3* mutáns *S. cerevisiae* sejtekben. Üres pWS93 plazmiddal, illetve *ScHAL3*, *ScCAB3*, *CaHAL3* és *CaCAB3* teljes leolvasási keretét tartalmazó pWS93 plazmiddal transzformáltunk *slt2*, illetve *slt2/hal3* mutáns *S. cerevisiae* sejteket. Ezen sejteket különböző koncentrációban ($OD_{620}=0,005$ és $0,0005$; minden szilárd tápagon először a töményebb, majd a 10x hígított transzformánsok láthatók) kicseppentettük a növekvő koncentrációban koffeint tartalmazó tápagarakra, majd 72 óra elteltével lefotóztuk. Hasonló eredményt kaptunk minimum két független transzformálási sorozat után. (A *slt2/hal3* mutáns vizsgálatát Cristina Molero végezte.)

Azért, hogy még érzékenyebben ki tudjuk mutatni a Hal3 ortológok hatását, a kísérletet *slt2/hal3* dupla mutánssal folytattuk. Az *slt2/hal3* dupla mutáns sejtek koffeinnel szemben

toleránsak, hiszen az *slt2* hiányában fellépő lítikus fenotípust a *hal3* hiánya gyengíti, de ha ezen sejtekben overexpresszáljuk az ScHal3 fehérjét, akkor erős koffein érzékenységet tapasztalunk (25. ábra). Az ScCab3 fehérje overexpressziója ezen sejtekben lényegében hatástalan. A CaHal3 fehérje azonos hatású az ScCab3 fehérjével, míg a CaCab3 overexpressziója az ScHal3 fehérjéhez hasonlóan jelentős koffein szenzitivitást okoz. Ebben az *in vivo* vizsgálatban is azt tapasztaltuk, hogy a CaCab3 fehérje az ScHal3 fehérjéhez hasonlóan viselkedik.

Eredményeinket összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a fenotípusos vizsgálatok során a *C. albicans*-ból származó Hal3 ortológok *S. cerevisiae*-ben való overexpressziója során a CaHal3 fehérjének nem volt ScHal3 komplementáló hatása, ezzel szemben a CaCab3 fehérje az ScHal3 fehérjéhez hasonló hatású a Ppz regulációval összefüggésbe hozható stresszhatások alatt. Tehát *in vivo* körülmények között csak a CaCab3 bizonyult Ppz regulátor fehérjének.

7. Megbeszélés

7.1 A CaPpz1 morfológiai szerepe

Az új típusú szerin/treonin specifikus protein foszfatáz Z csak gombákban található meg. Több gombafajban leírták és jellemezték. A *C. albicans*-ban található protein foszfatáz Z-ről elmondható, hogy csak egyetlen gén, a *CaPPZ1* kódolja, amelyet Kovács és munkatársai írtak le 2010-ben. A *CaPPZ1* gén termékét, a CaPpz1 fehérjét Ádám és munkatársai jellemezték 2012-ben. A CaPpz1 funkciójáról tudjuk, hogy a *S. cerevisiae* ScPpz1 fehérjéhez nagyon hasonló feladatot lát el, ugyanis szerepet játszik a sejtfal integritás, az ozmotikus stabilitás kialakításában, a kation homeosztázisban és az oxidatív stresszválaszban (Ádám és mtsai., 2012; Leiter és mtsai., 2012). Ezen kívül kimutatták, hogy a CaPpz1 hozzájárul az opportunistá patogén gomba virulenciájához (Noble és mtsai., 2010, Ádám és mtsai., 2012). Mivel a *C. albicans*-ban a hifa képzésnek fontos szerepe van a szisztémás mikózis kialakulásában, megvizsgáltuk a CaPpz1 fehérje morfológiában betöltött szerepét.

A *C. albicans*-ban található *CaPPZ1* gén terméke a CaPpz1 fehérje morfológiában betöltött szerepét két lépésben határoztuk meg. Előkísérletek során a *cappz1* deléciós mutáns törzset az anyai (SN87) törzzsel hasonlítottuk össze. Ezen vizsgálatok során a törzsek hifa növekedést serkentő FBS jelenlétében és hiányában a hifahossz jelentős eltérést mutatott a két törzs között. A *cappz1* homozigóta deléciójának következtében a sejtek csökkent mértékű hifaképzése volt a jellemző (13. ábra). A foszfatáz egyik alléljának a kiütése nem okozott jelentős változást (9. táblázat), ami azért fontos, mert arra utal, hogy a mutagenézis során használt markergének (a *LEU2* és *HIS1*) nem okoznak jelentős méretbeli változást. Tehát a hifanövekedésben mutatott különbség minden valószínűség szerint a CaPpz1 foszfatáz teljes hiányának tudható be.

A kezdeti biztató eredmények megerősítése és kiegészítése érdekében további munkánkban a *cappz1* deléciós mutánssal teljesen megegyező genetikai háttérű QMY23 kontroll törzset használtuk összehasonlítási alapként és a fix időpontos szakaszos megfigyelés helyett videomikroszkópos módszert adaptáltunk a *C. albicans* morfológiai átalakulásának jellemzésére. Az általunk kialakított rendszerben több párhuzamos kísérlet során több órán át mozgathatás nélkül meg tudtuk figyelni a sejtek hifaképzését. A megfelelő kontroll alkalmazásával és a folyamat kinetikájának követésével megerősítettük az előkísérletek során kapott

eredményeket, miszerint a *cappz1* hiánya csökkenti a hifaképzés sebességét (14. ábra). A videomikroszkópos módszer az eddigi kísérletek megerősítésén túl további információval is szolgált. A hifanövekedés kinetikáját vizsgálva megfigyelhető a hifanövekedés eloszlása, amely a kontrollban normál esetben várható harang görbe alakú volt.. A *cappz1* gén hiányában a sebességeloszlási görbe nem követte a normál eloszlást, ami szintén az abnormális hifanövekedést támasztotta alá (14. ábra). Az általunk használt videomikroszkópos módszerrel detektálhatóvá vált a sejtek tenyésztőedényhez történő letapadása is. Azt találtuk, hogy a *cappz1* deléciós mutáns csak lassabban tudott a felületre letapadni, mint a kontroll törzs (15. ábra).

Eredményeinket összefoglalva elmondhatjuk, hogy egy új videomikroszkópos módszert adaptáltunk a *Candida* morfológia vizsgálatához, amely segítségével képesek voltunk a sejtek adhézióját és hifa növekedését hosszú időn át folyamatosan megfigyelni. Ez a módszer alkalmazhatónak bizonyult nemcsak a CaPpz1 a tanulmányozására, hanem más mutációk és adalékanyagok morfológiai hatásának elemzésére is (Nagy és mtsai., 2014).

Ezen vizsgálatok azért is jelentősek, mert a a hifaképzés befolyásolhatja az opportunistá patogén fertőzőképességét (Pukkila-Worley és mtsai., 2009; Dalle és mtsai., 2010). Ezek az ismeretek hozzásegítenek egy távlati cél eléréséhez, amely egy olyan jelátviteli terápia lenne, amely gombaszpecifikusan a hifaképzést gátolná. A jövő gombaterápiája opportunistá patogének esetén nem a gomba teljes eliminálása, hanem a hifa forma kialakulásának gátlása lenne. Az opportunistá patogének teljes eliminálásnak veszélye a mikrobióm felborulása, ezáltal más opportunistá patogének vagy patogének túlszaporodása a gazdaszervezetben. Az eddigi kísérletek azt mutatják, hogy a gombaszpecifikus protein foszfatáz, a CaPpz1 lehetséges terápiás célpont lehet (Chen és mtsai., 2016).

7.2 A CaPpz1 regulációja Hal3 ortológokkal

A protein foszfatáz Z fehérjét már több gombafajban leírták. Ezen fehérjék szerkezetéről elmondható, hogy tartalmaznak egy jól konzerválódott, globuláris szerkezetű C-terminális katalitikus domént, és egy rendezetlen szerkezetű N-terminális domént, amelyek egymással csak kismértékű azonosságot mutatnak. A CaPpz1 katalitikus domén szerkezetét Chen és munkatársai írták le 2016-ban. Ez a domén nagyfokú szekvencia azonosságot mutat a PP1c fehérjével, ezért megvizsgálták, hogy a PP1c regulátor fehérjék kötőhelye konzerválódott-e a CaPpz1 katalitikus doménjében. A vizsgálat során a PP1c regulátorok nagy része nem volt

hatásos gátlószer. Tehát a CaPpz1 szabályozása klasszikus foszfatáz gátlószerekkel nem lehetséges. Ezért fontos a CaPpz1-specifikus regulátorok kimutatása.

S. cerevisiae-ben írták le először a Hal3 fehérjét, mint az ScPpz1 specifikus regulátorát (de Nadal és mtsai., 1998). A Hal3 fehérjének három paralógja van *S. cerevisiae*-ben: a Hal3, Vhs3 és Cab3. A három fehérje együtt heterotrimert képez és részt vesz a CoA bioszintézisben, a PPCDC enzim alegységként. Viszont a Hal3 és Vhs3 fehérjéknek moonlighting funkciója is ismert, a CoA bioszintézis mellett specifikus Ppz regulátor fehérjék. A Cab3 fehérjének nincs hatása a Ppz fehérje foszfatáz aktivitására (Ruiz és mtsai., 2009). Munkánk során a *C. albicans*-ban található Hal3 ortológokat vizsgáltuk, mint lehetséges természetes CaPpz1 regulátor fehérjéket.

Bioinformatikai analízissel azonosítottuk a *C. albicans*-ban található két Hal3 ortológ szekvenciáját: a CaHal3 (orf19.7378) és a CaCab3 (orf19.3260) fehérjét (lásd. 3.6 fejezet). A szekvencia analízis során megállapítottuk, hogy a CaHal3 fehérje szekvenciája nagy azonosságot mutat az ScHal3 fehérjével. A CaHal3 fehérjében konzerválódott a PPCDC aktivitáshoz szükséges hisztidin aminosav. A családfa analízis szerint a CaHal3 fehérje a Hal3 fehérjékkel van rokonságban. Mindezek után az volt a hipotézisünk, hogy a CaHal3 képes betölteni a ScHal3 szerepét a CoA bioszintézisben, és specifikus Ppz regulátor fehérje is.

A CaCab3 fehérje szekvenciája nagy azonosságot mutat az ScCab3 fehérjével. A CaCab3 tartalmazza az ScCab3-hoz hasonlóan a PPCDC aktivitáshoz nélkülözhetetlen cisztein aminosavat és az Asn motívumot. A filogenetikai fa analízis is alátámasztotta, hogy a CaCab3 a Cab3-szerű fehérjékhez tartozik. A CaCab3 bioinformatikai analízise után az volt a hipotézisünk, hogy a CaCab3 az ScCab3 fehérjével azonosan fontos PPCDC alegység, de nem rendelkezik moonlighting funkcióval, tehát nem Ppz regulátor fehérje. Azonban felfigyeltünk arra is, hogy a CaCab3 fehérje tartalmaz egy extra 30 aminosav hosszúságú nem homológ szekvenciát, amely csak az ScHal3 fehérjében fordul még elő, és amiről feltételezhető, hogy szerepe lehet a CaPpz1 regulációjában.

Munkahipotézisünk ellenőrzésére biokémiai és molekuláris genetikai kísérletekkel elemeztük a Hal3 ortológok funkcióját. Elsőként a Hal3 fehérjék esszenciális funkcióját, a CoA bioszintézisben betöltött szerepét tanulmányoztuk. *S. cerevisiae* modell szervezetben tetrád analízissel vizsgáltuk a funkcionális megfeleléseket, és azt tapasztaltuk, hogy a CaHal3 fehérje az ScHal3 fehérjével megegyező módon funkcióképes PPCDC alegységként viselkedett (10. táblázat). A CaCab3 fehérje csak az ScCab3 fehérje hiányát tudta komplementálni, így a CaCab3 az ScCab3 fehérjével megegyező funkcióképes PPCDC alegység *S. cerevisiae* sejtekben (10. táblázat). Tehát a CaHal3 és CaCab3 fehérjék funkcióképes PPCDC alegységek,

azaz a CoA bioszintézisben betöltött esszenciális funkciók a várakozásnak megfelelő módon megőrződtek a *C. albicans* Hal3 ortológokban.

Munkánk további részében a Hal3 ortológok Ppz regulációban betöltött szerepét, vagyis moonlighting funkcióját vizsgáltuk. Először pull down módszerrel tanulmányoztuk *in vitro* körülmények között, hogy a CaPpz1 katalitikus doménjéhez, illetve a teljes hosszúságú CaPpz1fehérjéhez kötődnek-e a *C. albicans*-ból származó Hal3 ortológok. Azt tapasztaltuk, hogy a CaPpz1 katalitikus doménjéhez erősen kötődik a CaHal3 és CaCab3 fehérje is (16. ábra), de a teljes hosszúságú CaPpz1 fehérjéhez is kötődik mindkét Hal3 ortológ (17-18. ábra). Ezek az eredmények összhangban vannak a *S. cerevisiae*-ben leírtakkal, miszerint nemcsak az ScHal3, hanem az ScCab3 fehérje is képes kötődni az ScPpz1 fehérjéhez (Ruiz és mtsai., 2009). Az ScCab3 fehérjének viszont nincs foszfatázgátló hatása (Ruiz és mtsai., 2009).

Miután tudtuk, hogy mind a két Hal3 ortológ interakcióba lép a CaPpz1 foszfatázzal, a továbbiakban a protein foszfatáz aktivitásra gyakorolt hatásukat vizsgáltuk *in vitro* rendszerben. A foszfatáz aktivitás vizsgálatok során módszertani újításként a szintetikus pNPP szubsztrátot érzékenyebb radioaktív ^{32}P -MLC20 fehérje szubsztrátra cseréltük. Ez az érzékeny radioaktív detektálási módszer különösen előnyös abban az esetben, amikor fehérje-fehérje kölcsönhatásokat kívánunk ellenőrizni. A vizsgálatok eredménye szerint a CaPpz1 és a katalitikus domén is képes defoszforilálni az MLC20 szubsztrátot. Azonban jelentős eltérés van a két foszfatáz forma specifikus aktivitása között: a teljes hosszúságú fehérjének sokkal kisebb a specifikus aktivitása, mint az N-terminális domént nem tartalmazó katalitikus doménnek. Ebből arra következtetünk, hogy az N-terminális domén csökkenti az enzim szubsztráthoz való kötődését, és ezáltal negatív regulátor szereppel rendelkezik. A CaHal3 és a CaCab3 fehérjék koncentrációfüggő módon gátolták a teljes hosszúságú CaPpz1 és a C-terminális domént tartalmazó fehérje foszfatáz aktivitását is (19. ábra). Az a tény, hogy *in vitro* körülmények között mind a CaHal3, mind pedig a CaCab3 képes foszfatáz aktivitást gátolni, ellentmondott az eddigi irodalmi adatoknak és várt hipotézisünknek. Ezért megvizsgáltuk, hogy ezen *C. albicans* Hal3 ortológok hogyan befolyásolják az ScPpz1 foszfatáz aktivitását. *In vitro* foszfatáz aktivitás vizsgálatok során azt tapasztaltuk, hogy az ScPpz1 és a C-terminális katalitikus domén képes defoszforilálni az új szubsztrátot, az MLC20-at. A teljes hosszúságú és a csak katalitikus domént tartalmazó fehérjék specifikus aktivitása a *Candida* fehérjékhez hasonlóan alakult, miszerint az ScPpz1-Cter specifikus aktivitása sokkal magasabb volt a teljes hosszúságú ScPpz1-hez képest. Tehát az egymással csak kismértékben azonos N-terminális domének azonos gátló funkciót láthatnak el a különböző eredetű Ppz enzimekben. Nemcsak a specifikus aktivitásban volt hasonlóság, hanem a Hal3 ortológok hatásában is: mind a CaHal3,

mind pedig a CaCab3 koncentrációfüggő módon gátolta az ScPpz1 és ScPpz1-Cter foszfatáz aktivitását. (20. ábra). Tehát *in vitro* körülmények között a CaHal3 és a CaCab3 specifikus foszfatáz regulátornak tekinthető.

Végül arra voltunk kíváncsiak, hogy a ScHal3 ortológok *in vivo* körülmények között is foszfatáz regulátorként viselkednek-e. Az *ppz1* deléziós mutánsról ismert volt, hogy toleráns sóstresszel (Posas és mtsai., 1995) és toxikus kationokkal szemben (Ferrando és mtsai., 1995; de Nadal és mtsai., 1998). Az irodalmi adatok szerint az élesztő sejtek toleránssá váltak sóstresszre és toxikus kation jelenlétére, ha *hal3* deléziós mutáns *S. cerevisiae* sejtekben ScHal3 fehérjét overexpresszálnak (Yenush és mtsai., 2002), viszont az ScCab3 fehérje inkább anti-Hal3 hatást mutat ezen stressz ágensek jelenlétében (Ruiz és mtsai., 2009). Tehát a Hal3 foszfatázgátló szerepének megfelelően hasonló fenotípus detektálható ScPpz1 hiányában, mint ScHal3 overexpressziójakor. Munkánk során *hal3* deléziós mutáns *S. cerevisiae* sejtekben expresszáltuk a Hal3 ortológokat. Az expresszió hatásosságát Western blottal támasztottuk alá. Amikor CaHal3 és CaCab3 fehérjéket expresszáltunk *S. cerevisiae* sejtekben, a várakozásainkkal ellentétben azt tapasztaltuk, a CaHal3 fehérjének nem volt hatása sóstresszel és toxikus kationokkal szemben, ezzel szemben a CaCab3 az ScHal3-hoz hasonlóan LiCl-dal és Hygrmycin B-vel szemben toleránssá tette a sejteket (22. ábra). A kísérlet hitelességét több módon is ellenőriztük (23. ábra: kolónia PCR, 24. ábra: sejtnövekedés limitáló kálium koncentráció mellett), és megállapítottuk, hogy a nem várt eredmény nem kísérleti hiba, hanem tényleg csak a CaCab3 fehérje viselkedik Ppz regulátorként *in vivo* körülmények között.

Irodalmi adatok alapján tudjuk, hogy az ScPpz1-nek közvetett szerepe van az *slt2* kináz mutáns sejtekben. *SLT2* hiányában lítikus fenotípus figyelhető meg, amelyet az ScPpz1 hiánya vagy az ScHal3 overexpressziója tovább súlyosbít. A lítikus fenotípus könnyen tesztelhető, ugyanis az *slt2* deléziós mutáns sejtek érzékenyek a sejtfal károsító ágensekre, mint például koffeinre. Ezért megvizsgáltuk, hogy a ScHal3 ortológoknak van-e hatása az *slt2* és *slt2/hal3* mutáns *S. cerevisiae* sejtekben. Az *slt2* mutánsokban expresszáltatott CaHal3 az ScCab3-ra jellemző anti-Hal3 hatást mutatott, míg a CaCab3 fehérje a CaHal3-hoz képest kisebb koffein toleranciát okozott (25. ábra). Az *slt2/schal3* dupla mutáns sejtekben végzett kísérlet a többi *in vivo* kísérlethez hasonlóan azt mutatta, hogy a CaHal3 fehérjének nem volt hatása, vagy az ScCab3-hoz hasonló gyenge anti-Hal3 hatása volt, ezzel szemben a CaCab3 fehérje az ScHal3-hoz hasonlóan viselkedett, tehát erősítette a lítikus fenotípust (25. ábra). Tehát egy másik genetikai háttérrel rendelkező mutánsban is azt találtuk, hogy a CaCab3 a foszfatáz fiziológiás regulátora.

A *Candida* Hal3 ortológokkal végzett kísérletes munka eredményeképpen elmondható, hogy a Hal3 ortológok elnevezése helyesen történt a bioinformatikai munka alapján. A CaHal3 és a CaCab3 fehérjék CoA bioszintézisben betöltött esszenciális funkciója megőrződött, mind a CaHal3, mind pedig a CaCab3 funkcionális PPCDC alegység.

A várákosokkal megegyezően mind a két Hal3 ortológ képes kötődni mind a CaPpz1 fehérjéhez, mind pedig a fehérje C-terminális katalitikus doménjéhez. A Hal3 ortológok erősebben kötődtek a CaPpz1-Cter-hez, mint a teljes hosszúságú fehérjéhez, ami bizonyítja, hogy a fehérjék a katalitikus doménhez kötődnek, és hogy az N-terminális domén gátolja a fehérje-fehérje komplex kialakulását.

In vitro foszfatáz aktivitásmérések szerint mind a két Hal3 ortológ koncentrációfüggő módon gátolta az CaPpz1 és az ScPpz1 fehérjék és katalitikus doménjeik foszfatáz aktivitását. Tehát *in vitro* körülmények között a CaHal3 és a CaCab3 egyaránt foszfatáz regulátorként viselkedik. Ezzel szemben az *in vivo* vizsgálatok során várákosainkkal ellentétben azt kaptuk, hogy a CaHal3 fehérjének nem volt hatása, vagy az ScCab3-hoz hasonló anti-Hal3 hatással rendelkezett *S. cerevisiae* sejtekben. Ezzel szemben a CaCab3 fehérjének az ScHal3 fehérjéhez hasonló fenotípusos hatása volt *hal3* deléciós *S. cerevisiae* törzsben sóstressz, toxikus kationok jelenlétében, illetve *slt2/hal3* *S. cerevisiae* duplamutáns sejtekben sejtfalkárosító ágensek mellett.

Ezen eredmények azt mutatják, hogy az esszenciális funkció evolúciósan megőrződött, és hogy a CaPpz1 regulációja, mint moonlighting funkció, ettől független utat követett *C. albicans*-ban. Elképzelhető, hogy a bioinformatikai analízis során talált 30 aminosav hosszúságú nem homológ szakasz, ami megtalálható az ScHal3 és CaCab3 fehérjében is, jelentőséggel bír a foszfatáz aktivitás gátlásában.

A Ppz enzimek rendezetlen szerkezetű N-terminális doménjének funkcióját eddig nem ismertük, de a bemutatott eredmények azt sugallják, hogy ennek a doménnek jelentős szerepe van a protein foszfatáz aktivitás és a fehérje-fehérje kölcsönhatások szabályozásában. Ennek a feltevésnek az igazolására azonban további kísérletek szükségesek.

8. Összefoglalás

A protein foszfatáz Z egy új típusú szerint/treonin specifikus protein foszfatáz, amely csak a gombákban mutatható ki. Az opportunistá patogén *Candida albicans*-ban egy gén, a *CaPPZ1* kódolja a CaPpz1 fehérjét, amely a jól ismert *Saccharomyces cerevisiae* ScPpz1 ortológjához hasonlóan szerepet játszik a sejtfal integritás és ozmotikus stabilitás kialakításában, a kation homeosztázisban és az oxidatív stresszválaszban. Munkánk során tanulmányoztuk a CaPpz1 további funkcióit és regulációs mechanizmusát.

A CaPpz1 fehérje szerepét a fonalas gomba hifaképzésben klasszikus mikroszkópia és a folyamatos követést biztosító videomikroszkópia módszerével vizsgáltuk. Mind a két kísérlet azt mutatta, hogy *cappz1* foszfatáz deléziós mutánsban csökken a hifanövekedés sebessége, valamint a gombasejtek felületi adhéziója. Tehát sikerült kimutatnunk a CaPpz1 eddig nem ismert morfológiai szerepét, ami összefüggésbe hozható a *C. albicans* fertőzőképességével.

S. cerevisiae-ben korábban már leírták a ScHal3 fehérjét, mint a ScPpz1 foszfatáz inhibitorát. Nemrégiben azt is kimutatták, hogy a ScHal3 fehérje két paralógjával (ScVhs3 és ScCab3) kiegészülve a heterotrimer foszfoantotenoil-cisztein dekarboxiláz (PPCDC) enzim alegysége, amely esszenciális szerepet játszik a CoA bioszintézisben. Bioinformatikai kereséssel *C. albicans*-ban két ScHal3 ortológot találtunk, amelyeket *S. cerevisiae* homológjukkal mutatott szekvencia hasonlóság alapján CaHal3 és CaCab3 fehérjéknek nevezünk. Ezen két fehérje fiziológiai szerepét vizsgálva igazoltuk, hogy mindkét ScHal3 ortológ megőrizte esszenciális funkcióját, és részt vesz a PPCDC holoenzim felépítésében. Ezen kívül rekombináns fehérjékkel végzett *in vitro* kísérletekkel bizonyítottuk, hogy mindkét fehérje kötődik a CaPpz1 enzimhez és képes annak protein foszfatáz aktivitását gátolni. A megfelelő *S. cerevisiae* deléziós mutánsok komplementálása alapján megállapítottuk, hogy a CaCab3 a ScHal3 fehérjéhez hasonló feladatokat lát el a foszfatáz gátlásához köthető vizsgálati körülmények között, ezzel szemben a CaHal3 fehérje hatástalan. Tehát *in vivo* körülmények között csak a CaCab3 bizonyult hatékony CaPpz1 regulátor fehérjének. Eredményeink szerint a CaHal3 és CaCab3 fehérjék PPCDC aktivitásban betöltött esszenciális szerepe konzerválódott az evolúció során, de a CaCab3 másodlagos foszfatázgátló funkciója ettől független úton alakult ki.

9. Summary

Protein phosphatase Z is a so called “novel” type Ser/Thr phosphatase that is restricted to the fungal kingdom. In the opportunistic pathogen *Candida albicans* there is only one gene (*CaPPZ1*) that codes for the CaPpz1 protein. The latter, like its better known *Saccharomyces cerevisiae* counterpart ScPpz1, is involved in the determination of cell wall integrity, preservation of osmotic stability, and cation homeostasis as well as in the mechanism of oxidative stress response. In the present study we investigated its additional roles and the ways of its regulation.

The function of CaPpz1 in the hypha formation of the filamentous fungus was analyzed by classical microscopy and by long term videomicroscopy. Both of the methods revealed a significant delay in the rate of hyphal outgrowth in the *cappz1* deletion mutant relative to the control strain. In addition the knockout mutant cell exhibited slower adhesion to solid surfaces. Thus we identified some novel morphological functions of CaPpz1 that may be related to the virulence of *C. albicans*.

The ScHal3 protein was originally described in *S. cerevisiae* as a specific ScPpz1 inhibitor. Recently, it has been reported that ScHal3 together with its two paralogs (ScVhs3 and ScCab3) acts as an essential subunit of the heterotrimeric phosphopanthotenoyl cysteine decarboxylase (PPCDC) enzyme that is required for CoA biosynthesis. In a database search we found two Hal3 orthologs in *C. albicans* that we termed CaHal3 and CaCab3 based on their amino acid sequence similarities to the *S. cerevisiae* counterparts. In the course of molecular genetic functional analysis we found that both of the *Candida* proteins preserved their essential function as building blocks of the PPCDC enzyme. In addition we demonstrated by *in vitro* experiments with recombinant proteins that both CaHal3 and CaCab3 bind to the CaPpz1 enzyme and are able to inhibit its protein phosphatase activity. The complementation of *S. cerevisiae* deletion mutants revealed that overexpression of CaCab3 was able to replace ScHal3 in functional tests that are related to phosphatase inhibition. In contrast, the CaHal3 protein proved to be ineffective under the same conditions. Our *in vivo* experiments suggest that only CaCab3 can act as a physiological regulator of CaPpz1. According to our results the essential functions of the CaHal3 and CaCab3 proteins as PPCDC subunits have been well conserved but the moonlighting function of CaCab3 as a phosphatase inhibitor evolved separately during evolution.

10. Tárgyszavak

Candida albicans

protein foszfatáz Z1

videomikroszkópia

Hal3

Cab3

CoA bioszintézis

fehérje-fehérje kölcsönhatás

Candida albicans

protein phosphatase Z1

videomicroscopy

Hal3

Cab3

CoA biosynthesis

protein-protein interaction

11. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek Dr. Dombrádi Viktor egyetemi tanárnak, hogy munkámat mindvégig elméleti és gyakorlati tanácsokkal segítette, hogy tényleges témavezetéssel irányította PhD kutatásom, és segítette ösztöndíj pályázataimat.

Szeretnék köszönetet mondani a Dombrádi munkacsoport egykori és jelenlegi munkatársainak: Dr. Kovács Lászlónak és Dr. Ádám Csabának, hogy szakdolgozóként megtanították nekem a laboratóriumi munka alapjait. Dr. Farkas Ilonának és Dr. Kerekes Évának, hogy elméleti és gyakorlati tanácsaikkal segítették munkámat. Köszönöm Tankáné Farkas Andrea és Kelemenné Szántó Ágota asszisztenseknek, akik a mindennapi munkában nyújtottak segítséget.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Boratkó Anitának a gyakorlati tanácsaiért, és hogy rendelkezésemre bocsájtotta JM109-es törzset.

Szeretnék köszönetet mondani kollaborációs partnereinknek:

Prof. Erdődi Ferencnek, hogy rendelkezésemre bocsájtották az ^{32}P -MLC20 szubsztrátot, és Kónya Zoltánnak, a foszfátáz vizsgálatokban nyújtott segítségével.

Prof. Bánfalvi Gáspárnak, Dr. Nagy Gábornak, Dr. Pócsi Istvánnak és Dr. Grant W Hennignek a videomikroszkópos vizsgálat során nyújtott technikai segítségért és informatikai elemzéséért.

Prof. Joaquin Arinonak, hogy két alkalommal is biztosította számomra, hogy laborjában dolgozhassak. Hálával tartozom az Arino munkacsoportnak, külön kiemelve Dr. Asier González és Cristina Molero, akik gyakorlati tanácsaikkal segítették munkámat és élesztős vizsgálatokban nyújtottak segítséget.

Szeretnék köszönetet mondani Prof. Alexander Johnson-nak, hogy rendelkezésünkre bocsájtotta a QMY23-as törzset és szeretnék köszönetet mondani Dr. Susan Noble-nak, aki rendelkezésünkre bocsájtotta az SN87-es törzset.

Végül, de nem utolsósorban szeretnék köszönetet mondani családomnak, páromnak és barátaimnak, akik lelkiileg támogattak és nyugodt hátteret biztosítottak.

Munkámat az alábbi pályázatok és ösztöndíjak tették lehetővé: OTKA K108989, Campus Hungary, TÁMOP 4.2.4. A/2-11-1-2012-0001 Nemzeti Kiválóság Program

12. Irodalom jegyzék

Internetes források

Internetes források utolsó sikeres letöltése: 2017.05.14.

E. coli törzsek genotípusa:

http://openwetware.org/wiki/E._coli_genotypes#BL21.28DE3.29

EZ-10 spin column plasmid DNA miniprep (Bio Basic) kit leírása:

<https://store.biobasic.com/resources/productinfo/Kit%20Brochure%20Complete%20-v20.pdf>

pET28a vektor térképe:

<https://www.staff.ncl.ac.uk/p.dean/pET28.pdf>

pGEX-6p-1 vektor térképe:

https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1314787424814/litdoc28962284_20161014223929.pdf

Irodalmi hivatkozások

Abrie JA, González A, Strauss E, Ariño J (2012) Functional mapping of the disparate activities of the yeast moonlighting protein Hal3. *Biochem J.* 2012 Mar 1; 442(2):357-68.

Adam, C., Erdei, E., Casado, C., Kovacs, L., Gonzales, A., Majoros, L., Petrenyi, K., Bagossi, P., Farkas, I., Molnar, M., Poci, I., Ariño, J., Dombradi, V., (2012) Protein phosphatase *CaPPZ1* is involved in osmotic stability, cell wall integrity and virulence of *Candida albicans*. *Microbiology* 158, 1258-1267.

Adams A, Gottschling DE, Kaiser CA, Stearns T. (1997) *Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; 1997.

Albert A, Martínez-Ripoll M, Espinosa-Ruiz A, Yenush L, Culiáñez-Macià FA, Serrano R. (2000) The X-ray structure of the FMN-binding protein AtHal3 provides the structural basis for the activity of a regulatory subunit involved in signal transduction. *Structure*. 2000 Sep 15;8(9):961-9.

Alem M.A., Oteef, M.D., Flowers, T.H., Douglas, L.J., (2006) Production of tyrosol by *Candida albicans* biofilms and its role in quorum-sensing and biofilm development. *Eukaryot Cell* 5, 1770-1779.

Balcells L, Gómez N, Casamayor A, Clotet J, Ariño J. (1997) Regulation of salt tolerance in fission yeast by a protein-phosphatase-Z-like Ser/Thr protein phosphatase. *Eur J Biochem.* 1997 Dec 1;250(2):476-83.

Balcells L, Martín R, Ruiz MC, Gómez N, Ramos J, Ariño J. (1998) The Pzh1 protein phosphatase and the Spm1 protein kinase are involved in the regulation of the plasma membrane H⁺-ATPase in fission yeast. *FEBS Lett.* 1998 Sep 18;435(2-3):241-4.

Balcells L, Calero F, Gómez N, Ramos J, Ariño J. (1999) The *Schizosaccharomyces pombe* Pzh1 protein phosphatase regulates Na⁺ ion influx in a Trk1-independent fashion. *Eur J Biochem.* 1999 Feb;260(1):31-7.

Barreto L, Canadell D, Petrezselyova S, Navarrete C, Maresova L, Perez-Valle J et al. (2011) A genomewide screen for tolerance to cationic drugs reveals genes important for potassium homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 2011; 10(9):1241–50

Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 May 7;72:248-54.

Camici G, Manao G, Cappugi G, Modesti A, Stefani M, Ramponi G. (1989) The complete amino acid sequence of the low molecular weight cytosolic acid phosphatase. *J Biol Chem.* 1989 Feb 15;264(5):2560-7.

Chen E, Choy MS, Petrényi K, Kónya Z, Erdődi F, Dombrádi V, Peti W, Page R. (2016) Molecular Insights into the Fungus-Specific Serine/Threonine Protein Phosphatase Z1 in *Candida albicans*. *MBio.* 2016 Aug 30;7(4).

Chen MX, Chen YH, Cohen PT. (1993) PPQ, a novel protein phosphatase containing a Ser + Asn-rich amino-terminal domain, is involved in the regulation of protein synthesis. *Eur J Biochem.* 1993 Dec 1;218(2):689-99.

Clotet J, Garí E, Aldea M, Ariño J. (1999) The yeast ser/thr phosphatases sit4 and ppz1 play opposite roles in regulation of the cell cycle. *Mol Cell Biol.* 1999 Mar;19(3):2408-15.

Cohen PT (1997) Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life. *Trends Biochem Sci.* 1997 Jul;22(7):245-51.

Da Cruz e Silva EF, Hughes V, McDonald P, Stark MJ, Cohen PT. (1991) Protein phosphatase 2Bw and protein phosphatase Z are *Saccharomyces cerevisiae* enzymes. *Biochim Biophys Acta.* 1991 Jun 13;1089(2):269-72.

Dalle F, Wächter B, L'Ollivier C, Holland G, Bannert N, Wilson D, Labruère C, Bonnin A, Hube B. (2010) Cellular interactions of *Candida albicans* with human oral epithelial cells and enterocytes. *Cell Microbiol.* 2010 Feb;12(2):248-71.

de Nadal, E., Clotet, J., Posas, F., Serrano, R., Gomez, N. & Arino, J. (1998). The yeast halotolerance determinant Hal3p is an inhibitory subunit of the Ppz1p Ser/Thr protein phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7357–7362.

de Nadal E, Fadden RP, Ruiz A, Haystead T, Ariño J. (2001) A role for the Ppz Ser/Thr protein phosphatases in the regulation of translation elongation factor 1B α . *J Biol Chem.* 2001 May 4;276(18):14829-34.

Di Como CJ, Bose R, Arndt KT. (1995) Overexpression of SIS2, which contains an extremely acidic region, increases the expression of SWI4, CLN1 and CLN2 in *sit4* mutants. *Genetics.* 1995 Jan;139(1):95-107.

Dombradi V, Krieglstein J, Klumpp S. (2002) Regulating the regulators. Conference on protein phosphorylation and protein phosphatases. *EMBO Rep.* 2002 Feb;3(2):120-4.

Dombrádi V. (szerkesztő) Molekuláris biológia módszerek jegyzet. Debrecen 2004

Erdődi F, Tóth B, Hirano K, Hirano M, Hartshorne DJ, Gergely P (1995) Endothall thioanhydride inhibits protein phosphatases-1 and -2A *in vivo*. *Am J Physiol.* 1995 Nov; 269(5 Pt 1):C1176-84.

Farkas I, Dombrádi V, Miskei M, Szabados L, Koncz C. (2007) Arabidopsis PPP family of serine/threonine phosphatases. *Trends Plant Sci.* 2007 Apr;12(4):169-76.

Feng ZH, Wilson SE, Peng ZY, Schlender KK, Reimann EM, Trumbly RJ. (1991) The yeast GLC7 gene required for glycogen accumulation encodes a type 1 protein phosphatase. *J Biol Chem.* 1991 Dec 15;266(35):23796-801.

Ferrando A, Kron SJ, Rios G, Fink GR, Serrano R. (1995) Regulation of cation transport in *Saccharomyces cerevisiae* by the salt tolerance gene HAL3. *Mol Cell Biol* 1995; 15(10):5470–5481

Fischer EH, Charbonneau H, Tonks NK. (1991) Protein tyrosine phosphatases: a diverse family of intracellular and transmembrane enzymes. *Science.* 1991; 253:401–406.

Gammeltoft S, Van Obberghen E. (1986) Protein kinase activity of the insulin receptor. *Biochem J.* 1986 Apr 1;235(1):1-11.

García-Gimeno MA¹, Muñoz I, Ariño J, Sanz P., (2003) Molecular characterization of Ypi1, a novel *Saccharomyces cerevisiae* type 1 protein phosphatase inhibitor. *J Biol Chem.* 2003 Nov 28;278(48):47744-52.

Gillum, A.M., Tsay, E.Y., Kirsch, D.R., (1984). Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* *ura3* and *E. coli* *pyrF* mutations. *Mol. Gen. Genet.* 198, 179-182.

Guan KL, Broyles SS, Dixon JE. (1991) A Tyr/Ser protein phosphatase encoded by vaccinia virus. *Nature.* 1991; 350:359–362

Hanaoka N, Takano Y, Shibuya K, Fugo H, Uehara Y, Niimi M. (2008) Identification of the putative protein phosphatase gene PTC1 as a virulence-related gene using a silkworm model of *Candida albicans* infection. Eukaryot Cell. 2008 Oct;7(10):1640-8.

Hughes V, Müller A, Stark MJ, Cohen PT. (1993) Both isoforms of protein phosphatase Z are essential for the maintenance of cell size and integrity in *Saccharomyces cerevisiae* in response to osmotic stress. Eur J Biochem. 1993 Aug 15;216(1):269-79. Erratum in: Eur J Biochem 1993 Sep 15;216(3):881.

Kovács L, Farkas I, Majoros L, Miskei M, Pócsi I, Dombrádi V. (2010) The polymorphism of protein phosphatase Z1 gene in *Candida albicans*. J Basic Microbiol. 2010 Dec;50 Suppl 1:S74-82.

Kupke T (2001) Molecular characterization of the 4'-phosphopantothienoylcysteine decarboxylase domain of bacterial Dfp flavoproteins. J Biol Chem. 2001 Jul 20;276(29):27597-604.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970 Aug 15; 227(5259):680-5.

Lee KS, Hines LK, Levin DE. (1993) A pair of functionally redundant yeast genes (PPZ1 and PPZ2) encoding type 1-related protein phosphatases function within the PKC1-mediated pathway. Mol Cell Biol. 1993 Sep;13(9):5843-53.

Lee S, Milgroom MG, Taylor JW. (1988) A rapid, high yield mini-prep method for isolation of total genomic DNA from fungi. Fungal Genet Newsl 1988;3523

Leiter É, González A, Erdei É, Casado C, Kovács L, Ádám C, Oláh J, Miskei M, Molnar M, Farkas I, Hamari Z, Ariño J, Pócsi I, Dombrádi V. (2012) Protein phosphatase Z modulates oxidative stress response in fungi. Fungal Genet Biol. 2012 Sep;49(9):708-16.

Lo, H.J., Köhler, J.R., DiDomenico, B., Loebenberg, D., Cacciapuoti, A., Fink, G.R., (1997) Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. Cell 90, 939–949.

Merchan S, Bernal D, Serrano R, Yenush L. (2004) Response of the *Saccharomyces cerevisiae* Mpk1 mitogen-activated protein kinase pathway to increases in internal turgor pressure caused by loss of Ppz protein phosphatases. *Eukaryot Cell*. 2004 Feb;3(1):100-7.

Minhas A, Sharma A, Kaur H, Rawal Y, Ganesan K, Mondal AK. (2012) Conserved Ser/Arg-rich motif in PPZ orthologs from fungi is important for its role in cation tolerance. *J Biol Chem*. 2012 Mar 2;287(10):7301-12.

Mitrovich, Q.M., Tuch, B.B., Guthrie, C., Johnson, A.D., (2007) Computational and experimental approaches double the number of known introns in the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Genome Res*. 17, 492–502.

Molero C, Petrényi K, González A, Carmona M, Gelis S, Abrie JA, Strauss E, Ramos J, Dombradi V, Hidalgo E, Ariño J. (2013) The *Schizosaccharomyces pombe* fusion gene hal3 encodes three distinct activities. *Mol Microbiol*. 2013 Oct;90(2):367-82.

Muñoz I, Ruiz A, Marquina M, Barceló A, Albert A, Ariño J. (2004) Functional characterization of the yeast Ppz1 phosphatase inhibitory subunit Hal3: a mutagenesis study. *J Biol Chem*. 2004 Oct 8;279(41):42619-27.

Muszkietta L, Carrion Sde J, Robinet P, Beau R, Elbim C, Pearlman E, Latgé JP. (2014) The protein phosphatase PhzA of *A. fumigatus* is involved in oxidative stress tolerance and fungal virulence. *Fungal Genet Biol*. 2014 May;66:79-85.

Nagy G, Hennig GW, Petrenyi K, Kovacs L, Poci I, Dombradi V, Banfalvi G. (2014) Time-lapse video microscopy and image analysis of adherence and growth patterns of *Candida albicans* strains. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2014 Jun;98(11):5185-94.

Navarrete C, Petrezselyova S, Barreto L, Martinez JL, Zahradka J, Arino J et al. (2010) Lack of main K⁺ uptake systems in *Saccharomyces cerevisiae* cells affects yeast performance in both potassium-sufficient and potassium-limiting conditions. *FEMS Yeast Res* 2010; 10(5):508–17

Noble, S. M. & Johnson, A. D. (2005). Strains and strategies for large scale gene deletion studies of the diploid human fungal pathogen *Candida albicans*. Eukaryot Cell 4, 298–309.

Noble SM, French S, Kohn LA, Chen V, Johnson AD. (2010) Systematic screens of a *Candida albicans* homozygous deletion library decouple morphogenetic switching and pathogenicity. Nat Genet. 2010 Jul;42(7):590-8.

Pappas PG, Rex JH, Lee J, Hamill RJ, Larsen RA, Powderly W, Kauffman CA, Hyslop N, Mangino JE, Chapman S, Horowitz HW, Edwards JE, Dismukes WE; NIAID Mycoses Study Group. (2003) A prospective observational study of candidemia: epidemiology, therapy, and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. Clin Infect Dis. 2003 Sep 1;37(5):634-43.

Patterson KI, Brummer T, O'Brien PM, Daly RJ. (2009) Dual-specificity phosphatases: critical regulators with diverse cellular targets. Biochem J. 2009 Mar 15;418(3):475-89.

Petrényi K, Molero C, Kónya Z, Erdődi F, Ariño J, Dombrádi V. (2016) Analysis of Two Putative *Candida albicans* Phosphopantothenoylcysteine Decarboxylase / Protein Phosphatase Z Regulatory Subunits Reveals an Unexpected Distribution of Functional Roles. PLoS One. 2016 Aug 9;11(8):e0160965.

Pongrácz J, Juhász E, Iván M, Kristóf K. (2015) Significance of yeasts in bloodstream infection: Epidemiology and predisposing factors of Candidaemia in adult patients at a university hospital (2010-2014). Acta Microbiol Immunol Hung. 2015 Sep;62(3):317-29.

Posas F, Casamayor A, Morral N, Ariño J. (1992) Molecular cloning and analysis of a yeast protein phosphatase with an unusual amino-terminal region. J Biol Chem. 1992 Jun 15;267(17):11734-40.

Posas F, Casamayor A, Ariño J. (1993) The PPZ protein phosphatases are involved in the maintenance of osmotic stability of yeast cells. FEBS Lett. 1993 Mar 8;318(3):282-6.

Posas F, Camps M, Ariño J. (1995) The PPZ protein phosphatases are important determinants of salt tolerance in yeast cells. J Biol Chem. 1995 Jun 2; 270(22):13036-41.

Pukkila-Worley R, Peleg AY, Tampakakis E, Mylonakis E. (2009) *Candida albicans* hyphal formation and virulence assessed using a *Caenorhabditis elegans* infection model. Eukaryot Cell. 2009 Nov;8(11):1750-8.

Ruiz A, Muñoz I, Serrano R, González A, Simón E, Ariño J (2004) Functional characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* VHS3 gene: a regulatory subunit of the Ppz1 protein phosphatase with novel, phosphatase-unrelated functions. J Biol Chem. 2004 Aug 13; 279(33):34421-30.

Ruiz A, González A, Muñoz I, Serrano R, Abrie JA, Strauss E, Ariño J (2009) Moonlighting proteins Hal3 and Vhs3 form a heteromeric PPCDC with Ykl088w in yeast CoA biosynthesis. Nat Chem Biol. 2009 Dec; 5(12):920-8.

Sanglard D (2002) Clinical relevance of mechanisms of antifungal drug resistance in yeasts. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2002 Nov;20(9):462-9; quiz 470, 479.

Sherman F. (1991) Guide to yeast genetics and molecular biology. Methods Enzymol 1991;1943–21

Sinkó J, Sulyok M, Denning DW. (2015) Burden of serious fungal diseases in Hungary. Mycoses. 2015 Oct;58 Suppl 5:29-33. Song W, Carlson M. (1998) Srb/mediator proteins interact functionally and physically with transcriptional repressor Sfl1. EMBO J. 1998 Oct 1;17(19):5757-65.

Su XD, Taddei N, Stefani M, Ramponi G, Nordlund P. (1994) The crystal structure of a low-molecular-weight phosphotyrosine protein phosphatase. Nature. 1994 Aug 18;370(6490):575-8.

Sudbery P, Gow N, Berman J. (2004) The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. Trends Microbiol. 2004 Jul;12(7):317-24.

Szőőr B, Fehér Z, Zeke T, Gergely P, Yatzkan E, Yarden O, Dombrádi V. (1998) pzl-1 encodes a novel protein phosphatase-Z-like Ser/Thr protein phosphatase in *Neurospora crassa*. Biochim Biophys Acta. 1998 Oct 14;1388(1):260-6.

Timofeev O, Cizmecioglu O, Settele F, Kempf T, Hoffmann I. (2010) Cdc25 phosphatases are required for timely assembly of CDK1-cyclin B at the G2/M transition. J Biol Chem. 2010 May 28;285(22):16978-90.

Tonks NK. (2013) Protein tyrosine phosphatases--from housekeeping enzymes to master regulators of signal transduction. FEBS J. 2013 Jan;280(2):346-78.

Vissi, E., Clotet, J., de Nadal, E., Barceló, A., Bakó, E., Gergely, P., Dombrádi, V. & Arino, J. (2001). Functional analysis of the *Neurospora crassa* PZL-1 protein phosphatase by expression in budding and fission yeast. Yeast 18, 115–124.

Winzeler, E. A., Shoemaker, D. D., Astromoff, A., Liang, H., Anderson, K., Andre, B., Bangham, R., Benito, R., Boeke, J. D. & other authors (1999). Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. Science 285, 901–906.

Yenush L, Mulet JM, Ariño J, Serrano R. (2002) The Ppz protein phosphatases are key regulators of K⁺ and pH homeostasis: implications for salt tolerance, cell wall integrity and cell cycle progression. EMBO J. 2002 Mar 1;21(5):920-9.

Zheng, X., Wang, Y., Wang, Y., (2004) Hgc1, a novel hypha-specific G1 cyclin-related protein regulates *Candida albicans* hyphal morphogenesis. EMBO J. 23, 1845-1856.



Nyilvántartási szám: DEENK/66/2017.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Petrényi Katalin
Neptun kód: HCADWZ
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Petrényi, K.**, Molero, C., Kónya, Z., Erdődi, F., Ariño, J., Dombrádi, V.: Analysis of Two Putative *Candida albicans* Phosphopantothenoylcysteine Decarboxylase / Protein Phosphatase Z Regulatory Subunits Reveals an Unexpected Distribution of Functional Roles.
PLoS One. 11 (8), e0160965, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0160965>
IF: 3.057 (2015)
2. Szemán-Nagy, G., Hennig, G. W., **Petrényi, K.**, Kovács, L., Pócsi, I., Dombrádi, V., Bánfalvi, G.: Time-lapse video microscopy and image analysis of adherence and growth patterns of *Candida albicans* strains.
Appl. Microbiol. Biotechnol. 98 (11), 5185-5194, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-014-5696-5>
IF: 3.337
3. Ádám, C., Erdei, É., Casado, C., Kovács, L., Gonzalez, A., Majoros, L., **Petrényi, K.**, Bagossi, P., Farkas, I., Molnár, M., Pócsi, I., Ariño, J., Dombrádi, V.: Protein phosphatase CaPpz1 is involved in cation homeostasis, cell wall integrity and virulence of *Candida albicans*.
Microbiology-(UK). 158 (5), 1258-1267, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.057075-0>
IF: 2.852





További közlemények

4. Chen, E., Choy, M. S., **Petrényi, K.**, Kónya, Z., Erdődi, F., Dombrádi, V., Peti, W., Page, R.:
Molecular Insights into the Fungus-Specific Serine/Threonine Protein Phosphatase Z1 in
Candida albicans.
mBio. 7 (4), e00872-16, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/mBio.00872-16>
IF: 6.975 (2015)
5. Molero, C., **Petrényi, K.**, Gonzalez, A., Carmona, M., Gelis, S., Abrie, J. A., Strauss, E., Ramos,
J., Dombrádi, V., Hidalgo, E., Ariño, J.: The *Schizosaccharomyces pombe* fusion gene *hal3*
encodes three distinct activities.
Mol. Microbiol. 90 (2), 367-382, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/mmi.12370>
IF: 5.026

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 21,247

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
9,246**

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

Debrecen, 2017.03.23.



14. Fűggelék