

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

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

Petrényi Katalin

Témavezető: Prof. Dr. Dombrádi Viktor



DEBRECENI EGYETEM
Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2017

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

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: Petrényi Katalin okleveles molekuláris biológus

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

Témavezető: Prof. Dr. Dombrádi Viktor, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora
tagok: Dr. Szatmári István, PhD
Dr. Pankotai Tibor, PhD

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Élettani Intézet könyvtára
2017. július 3. 11:00 óra

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Biró Sándor, az MTA doktora
Dr. Balla András, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Biró Sándor, az MTA doktora
Dr. Balla András, PhD

Dr. Pankotai Tibor, PhD
Dr. Szatmári István, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK,
Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme
2017. július 3. 13:00 óra

1. Bevezetés

A *Candida albicans* egy opportunistá patogén gomba, amely fízíológíás körülmények között is megtalálható az egészséges emberi szervezetben, azonban immunhiányos betegekben túlszaporodva mycosist okoz. A klinikákon *Candida albicans* okozza a leggyakoribb gombafertőzést. A fertőzés kialakulását nagyban befolyásolják a gomba morfológiai változásai. Kimutatták, hogy a hifa és a pszeudohifa formák kialakulása elősegíti a mycosist. 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. Ezért szükséges új potenciális terápíás célpontok keresése. A candidiasis kezelés során nem szükségszerűen a gomba teljes eliminálása a cél, hiszen a candida fízíológíás körülmények között is megtalálható a szervezetben, és teljes kipusztításának hatására más patogén gombák vagy baktériumok 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 foszfatázok a felelősek. A protein foszfatáz Z (PPZ) egy olyan új típusú szírint/treonin protein foszfatáz, amelyet először *Saccharomyces cerevisiae*-ben írtak le, majd számos gombafajban, többek között a *C. albicans*-ban is kimutattak. Mivel a PPZ fontos élettani folyamatokban vesz részt és csak a gombában található meg potenciális célpontja lehet a jelátviteli terápíának.

A *C. albicans*-ban egyetlen protein foszfatáz Z-t kódoló gén található a *CaPPZ1*. A *CaPPZ1* gént és termékét a CaPpz1 fehérjét munkacsoportunk írta le és jellemezte. Kimutattuk, hogy a CaPpz1 fehérje szerepet játszik a sóháztartásban, a membránpotenciál kialakításban, a sejtfa integritásban, és az oxidatív stressz-válaszban, és igazolták, hogy a foszfatáz gén delécíója csökkent virulenciát okoz. Mivel a *C. albicans* fertőzést befolyásoló egyik tényező az élesztő-hifa morfológiai átmenet 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 C-terminális katalitikus doménjének homológ modellezéssel készített és Rtg-diffrakcióval meghatározott szerkezetét is ismerjük. Együttműködő partnereinkkel igazoltuk, hogy a

CaPpz1 katalitikus doménje és a jól ismert protein foszfatáz 1 katalitikus alegység (PP1c) szerkezete nagyon hasonló, bár vannak olyan szerkezeti elemek is, amelyek a CaPpz1-re specifikusak. Biokémiai kísérleteink szerint a tipikus PP1c regulátor fehérjék nem befolyásolják a CaPpz1 enzim foszfatáz aktivitását. A megváltozott reguláció oka lehet az, hogy a regulátor-kötő motívumok kritikus aminosav maradékai nem konzerválódtak, illetve az, hogy a CaPpz1 egyedi szerkezeti elemei, köztük az eredendően rendezetlen szerkezetű N-terminális domén gátolják a tipikus PP1c kölcsönható fehérjék kötődését. Tehát a szerkezeti és biokémiai vizsgálatok kizárták azt a lehetőséget, hogy a PP1c regulátorai fontos szerepet játszanak a CaPpz1 szabályozásában. Ezért fontos a CaPpz1 specifikus regulátorok kutatása a *C. albicans*-ban.

Korábban már leírták, hogy *S. cerevisiae*-ben a ScPpz1 speciális regulátora a ScHal3 fehérje. Bebizonyították, hogy a ScHal3 és egyik paralógja, a ScVhs3 fehérje, képesek gátolni a ScPpz1 foszfatáz aktivitását. Később kiderült, hogy a ScHal3 két homológjával (ScVhs3 és ScCab3) kiegészülve a sarjadzó élesztőben heterotrimert képez és így létrehozza a foszfoantotenoil-cisztein dekarboxiláz (PPCDC) holoenzimet, ami részt vesz a CoA bioszintézisben. Tehát a ScHal3 egy olyan „moonlighting” fehérje, amely alapvetően fontos a CoA szintéziséhez, de másodállásban a ScPpz1 foszfatáz aktivitását is szabályozza. Bioinformatikai kutatásunk eredményeként *C. albicans*-ban megtaláltuk a ScHal3 két ortológját, amelyeket aminosav szekvenciájuk alapján CaHal3-nak és CaCab3-nak neveztünk el. Munkánk során megvizsgáltuk az általunk azonosított két *Candida* fehérje funkcióját.

2. 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 tetrad 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 expresszáltatni 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.

3. Módszerek

3.1 Mikroszkópos vizsgálatok

A hifa növekedés vizsgálatára a szülői SN87 és a *cappz1* homozigóta foszfatáz deléciós mutáns törzsekből, illetve a heterozigóta mutánsokból (*CaPPZ1-LEU2* és *CaPPZ1-HIS1*) növesztett *C. albicans* sejteket Olympus BX40 mikroszkóp alatt lefotóztuk. A hifák hosszát az Image J programmal analizáltuk.

3.2 Videomikroszkópia

Videomikroszkópos analízishez a *cappz1* mutáns törzset és a vele teljesen megegyező genetikai háttérrel rendelkező QMY23 kontroll törzset használtuk. Az ezekből nyert sejtszuspenziót RPMI médiumban 37 °C-on, 5% CO₂ jelenlétében 5 órán keresztül vizsgáltuk úgy, hogy 5 másodpercenként mikroszkópos képeket készítettünk 4 párhuzamos mintáról az inkubátorba helyezett 4 Olympus mikroszkóppal. A 4 CCD kamerával rögzített képsorozat kiértékelése az együttműködő partnereink általunk készített software segítségével történt.

3.3 Élesztő növekedési teszt

Munkánk során különböző Hal3 homológ DNS inzertet tartalmazó pWS93 plazmidokkal transzformáltunk vad típusú (BY4741) és *hal3* mutáns *S. cerevisiae* sejteket. A transzformánsokat SD-Ura táptalajban növesztettünk. A tenyészetekből azonos sejtszámú mintákat cseppentettünk ki a kontroll és a különböző koncentrációban stressz hatású anyagokat tartalmazó YPD lemezekre. 48 és 72 óra inkubálási idő elteltével a lemezeket lefényképeztük.

3.4 Tetrád analízis

A transzformált *S. cerevisiae* sejtekből 1-1 telepet SD-Ura táptalajban tenyésztettük egy éjszakán át, majd az ebből vett mintákat INE folyékony táptalajban növesztettünk tovább több napon át 28 °C-on 180 rpm rázatás mellett. A sejtenyészetből izolált tetrádokat MSM 300 Yeast Dissection Microscope (Singer Instruments) mikroszkóp alatt választottuk szét. A tetrádok genotípusát további szelektáló lemezekben való növesztéssel határoztuk meg.

3.4 DNS klónozás

A *C. albicans* genomi DNS targetból kiindulva *CaHAL3* teljes leolvasási keretét PCR segítségével sokszorosítottuk fel. A PCR reakciók során Phusion és Phire polimeráz enzimeket és Eppendorf Mastercycler® készüléket használtunk. Inzertek és vektorok restrikciós hasítását Promega gyártmányú enzimekkel végeztük. A megfelelő restrikciós enzimekkel és foszfátáz kezeléssel előkészített inzerteket és vektorokat ligálás után baktérium, vagy élesztő sejtekbe transzformáltuk. Kompetens *E. coli* sejtek CaCl_2 kezeléssel készítettünk. A *S. cerevisiae* sejtek transzformálását LiAc előkezelés után PEG jelenlétében végeztük. A szelekciós markerek segítségével szelektált sejtekből izolált vektor konstrukciók helyességét DNS szekvenálással ellenőriztük.

3.5 Rekombináns fehérjék termeltetése

Rekombináns fehérjéket BL21 DE3 RIL *E. coli* sejtekben termeltettük. A pET28a plazmiddal transzformált sejtek tenyésztése kanamycin és kloramfenikol jelenlétében történt, míg a pGEX6p-1 vektor használata esetén ampicillint és kloramfenikolt adtunk a táptalajhoz. A CaPpz1 és CaPpz1-Cter katalitikus domén expressziója során MnCl_2 -dal egészítettük ki a táptalajt. A fehérjék expresszióját minden esetben optimalizáltuk, így minden fehérjét különböző IPTG koncentráció mellett, különböző hőmérsékleten, és más-más ideig termeltettünk.

3.6 Rekombináns fehérjék tisztítása affinitás kromatográfiával

A fehérje expresszió után összegyűjtött baktérium sejteket feltártuk, majd centrifugálással elválasztottuk a sejtörmeléket a szolubilizált fehérjéktől. A GST-címkét hordozó rekombináns fehérjéket Glutation Sepharose 4B gyantán tisztítottuk „batch” technikával. GST tag nélküli tiszta fehérjék lehasítása a gyantáról PreScission proteáz hozzáadásával történt. A CaPpz1 fehérje bakteriális termeltetésére pET28a vektort használtuk. A 6 x His címkével ellátott fehérje tisztításához Ni-NTA gyantát használtunk. A fehérje koncentrációját Bradford módszerével határoztuk meg. A preparátumokat SDS poliakrilamid gél elektroforézissel jellemeztük Laemmli szerint.

3.7 Fehérje-fehérje kölcsönhatások kimutatása „pull down” módszerrel

Elsőkísérleteinkhez GST címkével ellátott CaPpz1 katalitikus domént (CaPpz1-Cter) tartalmazó Glutation Sepharose 4B gyantát használtunk. Ezt folyamatos forgatás mellett 25°C-on 40 percig inkubáltuk a tisztított CaHal3, CaCab3 és ScCHal3 rekombináns fehérjékkel. A gyantáról eluált fehérjéket SDS poliakrilamid gélben elválasztottuk és

Coomassie Brilliant Blue festékkel festettük meg. Ezzel a detektálási módszerrel csak a legerősebb kölcsönhatások kimutatására volt mód.

Az úgynevezett reverz „pull down” elrendezésben a GST-címkés lehetséges gátló fehérjéket kötöttük Glutathion Sepharose 4B gyantához. A gyantákat 6xHis címkével ellátott CaPpz1 fehérjével inkubáltuk, majd a gyantáról eluált fehérjéket SDS-poliakrilamid gélben elválasztottuk, Hybond ECL membránra vittük át és a foszfatázt anti-His antitest felhasználásával Western blottal detektáltuk. Ez a módszer már a gyengébb kölcsönhatások detektálására is lehetőséget adott.

A fehérje-fehérje interakciók megerősítésére olyan „pull down” kísérletet végeztünk, amelyben a GST-címkés CaPpz1 fehérjét Glutathion Sepharose 4B gyantához kapcsoltunk, és ezt *S. cerevisiae*-ben termeltetett HA-címkével ellátott kölcsönható fehérjével inkubáltunk. A címkézett fehérjéket előzetesen nem tisztítottuk, hanem a megfelelő élesztő fehérje kivonatokat használtuk az inkubáció során. A gyantához kapcsolódott fehérjéket elúció után SDS gélelektroforézissel elválasztottuk, és Western bloton anti-HA elleni antitesttel detektáltuk.

3.10 Protein foszfatáz aktivitás mérés

A különböző protein foszfatáz Z1 enzimformák aktivitásának mérésére ^{32}P jelöléssel ellátott miozin-könnyűlánc (^{32}P -MLC) szubsztrátot használtunk. Az általunk bevezetett érzéken radioaktív eljárással 2 mM MnCl_2 jelenlétében határoztuk meg a CaPpz1, CaPpz1-Cter, ScPpz1 és ScPpz1-Cter rekombináns enzimek aktivitását.

4. Eredmények és megbeszélésük

4.1 A CaPpz1 morfológiai szerepe

A *C. albicans*-ban található *CaPPZ1* gén terméke a CaPpz1 fehérje morfológiában betöltött szerepét két lépésben vizsgáltuk meg. Előkísérletünkben a *cappz1* deléciós mutáns törzset az anyai (SN87) törzzsel hasonlítottuk össze a hifázást serkentő FBS jelenlétében és e nélkül. A *cappz1* homozigóta deléciós mutánsban a sejtek hifaképzése szignifikánsan lassabbnak adódott mindkét kísérleti elrendezésben. A foszfatáz egyik alléljának a kiütése nem okozott jelentős változást, ami azért fontos, mert arra utal, hogy a mutagenézis során a *Candida* genomba beépített markergének (*LEU2* és *HIS1*) önmagukban nem befolyásolják ezt a fenotípust. Tehát, a hifa növekedésben 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 hátterű QMY23 kontroll törzset használtuk összehasonlítási alapként és a fix időpontos szakaszos megfigyelés helyett egy videomikroszkópos módszert adaptáltunk a *C. albicans* morfológiai átalakulásánk jellemzésére. Az általunk kialakított rendszerben több párhuzamos kísérlet során több órán át követni figyelnünk a sejtek hifaképzését. A korrekt kontrol alkalmazásával és a folyamat kinetikájának követésével megerősítettük azt az eredményeket, miszerint a *cappz1* hiánya csökkenti hifaképzés sebességét. A videomikroszkópos módszer az eddigi kísérletek megerősítésén túl további információval is szolgált. A hifanövekedés eloszlása 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. Továbbá 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 latapadni, mint a kontroll törzs.

Eredményeinket összefoglalva elmondhatjuk, hogy egy új videomikroszkópos módszert adaptáltunk a *Candida* morfológia vizsgálatához, amely segítségével képesek voltunk a sejtek adhézióját és hifázását hosszú időn át folyamatosan megfigyelni. Ez a módszer alkalmazhatónk bizonyult nem csak a CaPpz1 a tanulmányozására, hanem más mutációk és adalék anyagok morfológiai hatásának elemzésére is.

A CaPpz1 morfológiai szerepének felismerése azért jelentős, mert a hifaképzés befolyásolhatja az opportunistá patogén fertőző képességét. Ezen ismeretek hozzásegíthetnek egy távlati cél eléréséhez, amely egy olyan jelátviteli terápia lenne amely komolyabb

mellékhatás nélkül specifikusan módon gátolná a hifaképzést. Az eredmények azt mutatják, hogy a gombaspecifikus protein foszfatáz a CaPpz1 egy lehetséges terápiás célpont.

4.2 A CaPpz1 regulációja

Korábban már ismert volt, hogy a *S. cerevisiae* modell organizmusban található ScHal3 fehérje a ScPpz1 foszfatáz természetes gátlószere. Bioinformatikai analízissel *C. albicans*-ban azonosítottunk két ScHal3 ortológot, az orf19.7378 és orf19.3260 jelű eddig még nem jellemzett gének termékeit. Megállapítottuk, hogy az orf19.7378 terméke a CaHal3 nagyfokú hasonlóságot mutat az ScHal3 foszfatáz inhibitorral. A CaHal3 fehérjében konzerválódott a PPCDC aktivitáshoz szükséges hisztidin aminosav. Filogenetikai analízisünk szerint a CaHal3 a Hal3 fehérjékkel van rokonságban. Mindezek alapján az volt a munkahipotézisünk, hogy a CaHal3 képes betölteni a ScHal3 szerepét a PPCDC holoenzimben és ezért nélkülözhetetlen a CoA bioszintéziséhez, ugyanakkor egy specifikus CaPpz1 regulátor fehérje is lehet. Az orf19.3260 terméke a CaCab3 inkább a ScCab3 fehérjével mutat rokonságot. Tartalmazza a PPCDC aktivitáshoz nélkülözhetetlen cisztein aminosavat és az úgynevezett Asn motívumot. A filogenetikai analízis alátámasztotta, hogy a CaCab3 a Cab3 szerű fehérjék családjába tartozik. Tehát joggal feltételeztük, hogy a CaCab3, az ScCab3 fehérjéhez hasonló módon, egy nélkülözhetetlen PPCDC alegység, de nem rendelkezik moonlighting funkcióval, azaz nem tekinthető CaPpz1 regulátor fehérjének. 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 szerepüket tanulmányoztuk. *S. cerevisiae* modell szervezetben tetrad analízissel vizsgáltuk a funkcionális megfeleléseket, és azt tapasztaltuk, hogy a CaHal3 a ScHal3 fehérjével megegyező módon funkcióképes PPCDC alegységként viselkedett. A CaCab3 fehérje pedig csak az ScCab3 fehérje hiányát tudta komplementálni, azaz a CaCab3 az ScCab3 fehérjével megegyező módon egy mások funkcióképes PPCDC alegység. Tehát a CaHal3 és CaCab3 fehérjék CoA bioszintézisben betöltött esszenciális funkciói a várakozásnak megfelelő módon megőrződtek a *C. albicans* ScHal3 ortológokban.

Munkánk további részében a ScHal3 ortológok CaPpz1 regulációjában betöltött szerepét, vagyis moonlighting funkcióját vizsgáltuk. Először pull down módszerrel

tanulmányoztuk *in vitro* körülmények között azt, hogy a CaPpz1 katalitikus doménjéhez illetve a teljes hosszúságú CaPpz1 fehérjéhez kötődnek-e a *C. albicans*-ból származó ScHal3 ortológok. Azt tapasztaltuk, hogy a CaPpz1 katalitikus doménje erősen köti a CaHal3 és CaCab3 fehérjéket, és a teljes hosszúságú CaPpz1 fehérjéhez is kötődik mindkét ScHal3 ortológ. Ezek az eredmények összhangban vannak a korábban leírtakkal, miszerint nem csak az ScHal3 hanem az ScCab3 fehérje is képes kötődni az ScPpz1 fehérjéhez. Viszont az irodalmi adatok szerint a ScCab3 fehérjének nincs foszfatáz gátló hatása.

Miután tudtuk, hogy mind a két ScHal3 ortológ interakcióba lép a CaPpz1 foszfatázzal, a továbbiakban a protein foszfatáz aktivitásra gyakorolt hatásukat vizsgáltuk *in vitro* rendszerben. A foszfatáz aktivitás meghatározásához módszertani újjáteként a szintetikus pNPP szubsztrátot érzékenyebb radioaktív ^{32}P -MLC20 fehérje szubsztrátra cseréltük. Ez az érzékeny radioaktív detektálási módszer különösen előnyös volt abban az esetben, amikor a fehérje-fehérje kölcsönhatásokat kívántuk ellenőrizni. A vizsgálatok eredménye szerint, a teljes hosszúságú CaPpz1 és katalitikus doménje is képes defoszforilálni az MLC20 szubsztrátot. Azonban jelentős eltérés találtunk 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 kötődését a fehérje szubsztráthoz, és ezáltal negatív regulátor szereppel rendelkezik. A CaHal3 és a CaCab3 fehérjék koncentráció-függő módon gátolták teljes hosszúságú CaPpz1 és a csonkolt, C-terminális katalitikus domén protein foszfatáz aktivitását is. Az a tény, hogy *in vitro* körülmények között mind a CaHal3 mind pedig a CaCab3 képes volt a foszfatáz aktivitást gátolni, ellentmondott az eddigi irodalmi adatoknak és munkahipotézisünknek. Ezért megvizsgáltuk, hogy a *C. albicans* ScHal3 ortológok, hogyan befolyásolják az ScPpz1 foszfatázt. *In vitro* foszfatáz aktivitásmérésünk igazolta, hogy az ScPpz1 és a C-terminális katalitikus doménje képes defoszforilálni az MLC20 szubsztrátot. Továbbá a teljes hosszúságú és a csak katalitikus domént tartalmazó fehérjék specifikus aktivitása a *Candida* fehérjékhez hasonlóan alakult, azaz az ScPpz1-Cter specifikus aktivitása sokkal magasabb volt a teljes hosszúságú ScPpz1-hez képest. Tehát az egymással alacsony aminosav szekvencia azonosságot mutató rendezetlen N-terminális domének azonos módon gátló szerepet láthatnak el a különböző eredetű Ppz enzimekben. Nem csak a specifikus aktivitásban volt hasonlóság, hanem a Hal3 ortológok hatásában is: mind a CaHal3 mind pedig a CaCab3 koncentráció-függő módon gátolta az ScPpz1 és ScPpz1-Cter foszfatázt. Tehát *in vitro* körülmények között a CaHal3 és a CaCab3 specifikus foszfatáz regulátorként viselkednek.

Végül arra voltunk kíváncsiak, hogy a ScHal3 ortológok *in vivo* körülmények között is foszfatáz regulátorként viselkednek-e. Ennek érdekében *hal3* deléciós mutáns *S. cerevisiae* sejtekben expresszáltuk a ScHal3 ortológokat. Az expresszió hatásosságát Western blottal támasztottuk alá. A *hal3* mutánsról ismert volt, hogy érzékeny só stresszel, és toxikus kationokkal szemben. Az irodalmi adatok szerint az élesztő sejtek toleránssá váltak ha ScHal3 fehérjét overexpresszáltak bennük, viszont az ScCab3 fehérje inkább anti-Hal3 hatást mutatott ezen ágensek jelenlétében. Amikor a CaHal3 fehérjét expresszáltunk a mutáns *S. cerevisiae* sejtekben a várakozásainkkal ellentétben azt tapasztaltuk, a CaHal3 fehérjének nem volt védő hatása só stresszel és toxikus kationokkal szemben. Ezzel szemben a CaCab3 az ScHal3-hoz hasonlóan LiCl-dal és Hygromycin B-vel szemben toleránssá tette a sejteket. A kísérletet hitelességét kolónia PCR-rel, és limitáló kálium koncentráció melletti fenotípusos vizsgálattal is ellenőriztük, 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 ismert tény, hogy az ScPpz1-nek közvetett szerepe van az *slt2* MAP kináz mutáns *S. cerevisiae* sejtekben. Az Slt2 kináz hiányában lítikus fenotípus figyelhető meg, amelyet a ScPpz1 hiánya vagy az ScHal3 overexpressziója tovább súlyosbít. A lítikus fenotípus könnyen tesztelhető, ugyanis az *slt2* deléciós 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 viszonyítva csökkentett koffein toleranciát okozott. Az *slt2/hal3* duplamutáns sejtekben végzett kísérlet a többi *in vivo* kísérlethez hasonlóan azt mutatták, 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. Tehát egy másik test rendszerben és egy összetettebb genetikai háttérrel rendelkező mutánsban is azt találtuk, hogy a CaCab3 a foszfatáz fiziológias regulátora.

Az ScHal3 ortológok esszenciális funkciójának vizsgálata azt igazolta, hogy a *C. albicans*-ban talált két, eddig még nem jellemzett, géntermék szerkezeti alapon végzett azonosítása helyes volt. A CaHal3 hasonlít a ScHal3-hoz és a CaCab3 megfelel az ScCab3-nak, ugyanis CoA bioszintézisben betöltött esszenciális szerepük megőrződött az evolúció során, mindketten a PPCDC enzim funkcionális alegységei.

A várakozásoknak megfelelően a CaHal3 és a CaCab3 protein képes kötődni mind a teljes hosszúságú CaPpz1 enzimhez, mind pedig annak C-terminális katalitikus doménjéhez.

A ScHal3 ortológok erősebben kötődtek a katalitikus doménhez, mint a teljes hosszúságú fehérjéhez, ami bizonyítja, hogy ezek a fehérjék az enzim C-terminális doménjéhez kötődnek, míg az N-terminális domén gátolja a fehérje-fehérje komplex kialakulását.

In vitro foszfatáz aktivitásmérések szerint mind a két ScHal3 ortológ koncentráció függő módon gátolta az CaPpz1 és az ScPpz1 enzimek és katalitikus doménjeik foszfatáz aktivitását. Tehát *in vitro* körülmények között mind a CaHal3 mind pedig a CaCab3 potenciális foszfatáz regulátorként viselkedik. Ezzel szemben fiziológias körülmények között, *in vivo* vizsgálatok során várakozásainkkal ellentétben azt kaptuk, hogy a CaHal3 fehérjének nem volt hatása, vagy az ScCab3-hoz hasonlóan anti-Hal3 hatással rendelkezett. Ezzel szemben a CaCab3 fehérjének az ScHal3 fehérjéhez hasonló hatása volt a *hal3* deléciós *S. cerevisiae* törzsben só stressz során, toxikus kationok jelenlétében, illetve a *slt2/hal3* *S. cerevisiae* duplamutáns sejtekben sejtfal károsító koffein jelenlétében.

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.

5. 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 sejtfa 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 deléciós 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 foszofopantotenoil-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 neveztünk. 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* deléciós 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.

Publikációs jegyzék



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR



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.

