

## Tudományos beszámoló

A pályázat célja a protein foszfatáz Z (PPZ), egy új típusú gombaszpecifikus protein foszfatáz funkciójának felderítése volt *Candida albicans*, *Aspergillus nidulans* és *Aspergillus fumigatus* gombafajokban. A vizsgált kutatási területen a következő eredményeket értük el:

### 1. A *Candida albicans* CaPPZ1 gén polimorfizmusa

A funkcionális vizsgálatok elvégzése érdekében először klónoztuk a *C. albicans*-ban található egyetlen PPZ kódoló gént a CaPPZ1-t, valamint az ennek megfelelő cDNS-t. A klónok szekvenálása során figyeltünk fel a gén nagyfokú polimorfizmusára. Korábban már ismert volt a diploid *C. albicans* jellegzetes genetikai variabilitása, mégis meglepetésként hatott a CaPPZ1 gén átlagosnál is nagyobb változékonysága. Kiderült, hogy a klinikai vizsgálatokban alkalmazott referenciatörzsek, valamint a beteganyagból izolált törzsek egyaránt erősen polimorfok. Eredményeink szerint a CaPPZ1 génnek legalább 4 allélje létezik, amelyen belül további kisebb szekvencia eltérések figyelhetők meg. A gén 3' nem-kódoló régiójában találtunk egy hipervariábilis szakaszt, amely felhasználhatónak bizonyult klinikai minták genotipizálására. A DNS szekvenáláson alapuló eljárás mellett RFLP alapú vizsgálati módszert is bevezettünk. A debreceni beteganyagból származó izolátumokban a CaPPZ1 5 allél kombinációját sikerült kimutatnunk (Kovács és mtsai., 2010). Részben ebből a témából készítette el és védte meg PhD disszertációját Kovács László.

Bár az általunk leírt módszer alkalmazható az orvosi diagnosztikában, széleskörű bevezetésének két akadályát látjuk:

- a. A gén nagyfokú polimorfizmusa miatt megvan a lehetőség arra, hogy az általunk alkalmazott három enzim restrikciós hasítási helye véletlenszerűen megváltozik, ezért az RFLP nem minden esetben ad egyértelmű eredményt.
- b. A hipervariábilis DNS szakasz szekvenálása elvileg kikezdetlen eljárás. A szakirodalom szerint korábban a *Candida* törzsek genotipizálására 7 génszakasz szekvenálásán alapuló MLST módszert vezették be, amit a pontosítás érdekében kiegészítettek még egy génszekvencia meghatározásával. Az így kialakított módszer kellő hatékonysággal jellemzi a lehetséges *Candida* kládokat, ezért egy újabb génszekvencia vizsgálatának bevezetése a gyakorlatban nem indokolt. Természetesen az eddig vizsgált 8 génszekvencia közül egy (vagy akár kettő is) kihagyható lenne, ha az átlagoshoz képest variábilisabb CaPPZ1 szekvenálását használnánk, azonban a már elfogadott módszer átalakítására kicsi az esély.

Annak ellenére, hogy az általunk kifejlesztett módszer nem valószínű, hogy a klinikai gyakorlatban alkalmazást nyer, a belőle levonható következtetések elméleti jelentőséggel bírnak. A foszfatáz katalitikus domént kódoló régióban található polimorfizmusok hatását az enzim aktivitására *in vitro* mutagenézissel tanulmányoztuk. Kimutattuk, hogy a G333E pontmutáció az enzimaktivitás növekedését okozza, a D261N mutáció kismértékű aktivitás csökkenést eredményez, míg a C337R csere az enzimaktivitás elvesztésével járt. Korábban azt találtuk, hogy a CaPPZ1-2 allélnak van egy olyan variációja, amelyben a G333E és a C337R mutáció együtt fordul elő, de kimutattuk, hogy ez az aktivitásvesztéssel járó kettős mutáció a természetben csak heterozigóta gombákban fordulhat elő. Ez az eredmény indirekt úton bizonyította, hogy a CaPPZ1 a *C. albicans*-ban fontos szerepet játszik. (Ádám és mtsai.,

2012). Az N-terminális domént kódoló szakasz polimorfizmusának jelentőségét még nem vizsgáltuk, ennek analízisét egy újabb kutatási tervben szeretnénk megvalósítani.

A gombák genotipizálásában szerzett módszertani jártasságunkat sikeresen kamatoztattuk baktérium törzsek molekuláris genetikai jellemzésére is (Dombrádi és mtsai., 2009).

## **2. A CaPPZ1 gén funkciói**

Eredeti terveink szerint a gén funkciójának felderítésére két stratégiát alkalmaztunk: (a) egyrészt elvégeztük a már korábban jellemzett *S. cerevisiae* és *S. pombe* PPZ mutánsok komplementálását a heterológ CaPPZ1 gén termeltetésével, (b) másrészt inaktívtuk a gént *C. albicans*-ban. Az utóbbi megközelítést tovább erősítettük azzal, hogy a deléciós mutánsba visszajuttattuk a vad típusú aktív CaPPZ1 gén egy kópiáját és ily módon menekítettük a mutáns fenotípust. Mindkét megközelítésünk arra az eredményre vezetett, hogy a CaPPZ1 részt vesz a gomba sóháztartásának szabályozásában, a sejtfa bioszintézisben és a membránpotenciál módosításában. Tehát a CaPPZ1 hasonló funkciókat lát el, mint az élesztőgombák ortológ foszfatázai. Ezen kívül kimutattuk, hogy a PPZ1 hiánya lecsökkentette a *C. albicans* hifázási sebességét és virulenciáját. Ezek a fonális gomba forma kialakulására, illetve a fertőzőképességre jellemző adatok az irodalomban új megfigyelésnek tekinthetők és felhívják a figyelmet arra, hogy a gombaszpecifikus CaPPZ1 potenciális target lehet a gombanövekedését gátló fungisztikus gyógyszerek kifejlesztése szempontjából (Ádám és mtsai., 2012).

A hifa növekedés ellenőrzésére egy új videofelvételeken alapuló technikát (Long Time Scanning, LTS) vezettünk be. A hosszú időtávú vizsgálatok eredményei összhangban állnak a rövidtávra vonatkozó mikroszkópos megfigyeléseinkkel, és felvetik annak a lehetőségét, hogy az egérfertőzési kísérletek előtt *in vitro* körülmények között kiszűrhetjük azokat a mutációkat, illetve foszfatázgátló szereket, amelyek az állatkísérletekben további vizsgálatra érdemesek. Bár a kísérleteket már elvégeztük az adatok feldolgozása még nem fejeződött be, mivel nem áll rendelkezésünkre megfelelő számítógépes kapacitás. Ezért ezeket az eredményeket csak egy későbbi időpontban tudjuk leközölni, illetve a módszert egy újabb pályázat kereti között kívánjuk hasznosítani.

## **3. Aspergillus fajok PPZ enzimeinek vizsgálata**

A funkcionális vizsgálatokat ebben az esetben is megelőzte az *A. fumigatus* és a *A. nidulans* ppzA és phzA gének és cDNS-ek klónozása és szekvenálása. A phzA gén és cDNS szekvenciák összehasonlítása alapján egy új intront találtunk, és ezzel korrigáltuk a korábban elfogadott gén struktúrájára vonatkozó elképzeléseket. Ezután a 2. pontban leírt stratégiát követve *S. cerevisiae* és *S. pombe* mutánsok felhasználásával bizonyítottuk, hogy a fenti két foszfatáz működőképes, ugyanis az élesztő mutánsokból hiányzó PPZ gén feladatait képesek voltak átvenni. Ennek ellenére, amikor elvégeztük az *A. nidulans* ppzA gén inaktíválását, azt tapasztaltuk, hogy a mutáns nem adta a sótoleranciában, sejtfa integritásában és membrán potenciában várható eltéréseket, azaz a PPZA gén nem mutatta a korábban megismert gomba PPZ foszfatázokra jellemző funkciókat. A lehetséges technikai hibák kizárása után széleskörű vizsgálatot indítottunk a gén eddig még nem ismert, új funkciójának felderítésére. Így jöttünk rá arra, hogy a deléciós mutáns érzékeny oxidálószerrel szemben, azaz felismertük, hogy az *A. nidulans* PPZA gén az oxidatív stressz mediálásában játszhat szerepet (Leiter és mtsai., 2012).

#### 4. A protein foszfatáz Z új funkciója

Az *A. nidulans* mutánsokkal kapott eredmények alapján felvetődött az a kérdés, hogy PPZ szerepe az oxidatív stresszben mennyire tekinthető általánosnak. Ennek megválaszolása érdekében megvizsgáltuk a *C. albicans* cappz1, valamint az *S. cerevisiae* ppz1 és ppz2 deléciós mutánsok oxidatív stressz tűrését is. A két egymástól genetikailag távol álló fajjal való kísérleteink megerősítették, hogy a PPZ enzimesalád tagjai a gombákban részt vesznek az oxidatív stressz mediálásában. Ezzel a PPZ foszfatázok egy általános, új szerepére hívtuk fel a figyelmet (Leiter és mtsai., 2012).

#### 5. Az új típusú protein foszfatázok evolúciója

A munkatervünkben nem szerepelt, és a témához csak lazán kapcsolódik az a bioinformatikai tanulmányunk, amelyben azt vizsgáltuk, hogy az új típusú protein foszfatázok hogyan jöttek létre az evolúció során. A *Drosophila* genom adatbázisok szekvencia adatainak vizsgálatával arra a következtetésre jutottunk, hogy az I. típusú új protein foszfatázok a klasszikus protein foszfatáz 1 (PP1) katalitikus alegységéből származnak (Miskei és mtsai., 2011). Ennek analógiájára úgy gondoljuk, hogy a gombákra specifikus PPZ foszfatázok a PP1 katalitikus alegység és egy N-terminális szabályozó régió fúziójával jöttek létre. Elvégeztük a gomba PPZ enzim család filogenetikai család analízisét (Leiter és mtsai., 2012), és elkezdtük a családtagok strukturális elemzését. A katalitikus domén homológ modellezése alátámasztotta a PPZ 1 katalitikus alegységgel való hasonlóságot (Ádám és mtsai., 2012.) Az eredendően rendezetlen szerkezetű N-terminális doménre vonatkozó analízisünk még folyamatban van és lehetőséget ad egy új kutatási téma felvetésére.

#### 6. Irodalmi hivatkozások

Dombrádi, Zs., Bodnár F., Orosi P., Dombrádi V. and Szabó J.: A case report on vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* colonization of a femoral wound in Central Europe. *Cent Eur. J. Med.* 4, 259-261 (2009) IF: 0.220

László Kovács, Ilona Farkas, László Majoros, Márton Miskei, István Pócsi and Viktor Dombrádi: The polymorphism of protein phosphatase Z1 gene in *Candida albicans*. *Journal of Basic Microbiology*, 50, 1–8 (2010) IF.: 1.05

Miskei M, Ádám C, Kovács L, Karányi Z, Dombrádi V. Molecular evolution of phosphoprotein phosphatases in *Drosophila*. *PLoS One*. 6:e22218. (2011) IF.: 4.411

Csaba Ádám, Éva Erdei, Carlos Casado, László Kovács, Asier González, László Majoros, Katalin Petrény, Péter Bagossi, Ilona Farkas, Monika Molnar, István Pócsi, Joaquín Ariño, Viktor Dombrádi: Protein phosphatase CaPpz1 is involved in cation homeostasis, cell wall integrity and virulence of *Candida albicans*. *Microbiology SGM*. (2012) In press IF: 2.954

Éva Leiter, Asier González, Éva Erdei, Carlos Casado, László Kovács, Csaba Ádám, Judit Oláh, Márton Miskei, Monika Molnar, Ilona Farkas, Zsuzsanna Hamari, Joaquín Ariño, István Pócsi and Viktor Dombrádi: Protein phosphatase Z modulates oxidative stress response in fungi. *Fungal Genetics and Biology* (submitted for publication)