



# *Plasmodium falciparum* metabolikus útvonalak mint maláriaellenes gyógyszercélpontok

Ph.D. tézis rövid összefoglalója

**Izrael Richard**

Témavezető: **Dr. Vértessy G. Beáta**

*Molekuláris Élettudományi Intézet,*

*Természettudományi Kutatóközpont,*

*Budapest*



*Multidiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola,*

*Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar,*

*Szegedi Tudományegyetem*



Budapest

2024



## **A Ph.D. tézis alapját képező publikációk listája:**

- **Izrael R**, Marton L, Nagy GN, Pálinkás HL, Kucsma N, Vértessy BG. Identification of a nuclear localization signal in the *Plasmodium falciparum* CTP: phosphocholine cytidyltransferase enzyme. *Sci Rep.* 2020 Nov 12;10(1):19739. doi: 10.1038/s41598-020-76829-1. PMID: 33184408; PMCID: PMC7665022.

**IF: 4,38, SJR Indicator: D1**

- Babai R\*, **Izrael R\***, Vértessy BG. Characterization of the dynamics of *Plasmodium falciparum* deoxynucleotide-triphosphate pool in a stage-specific manner. *Sci Rep.* 2022 Nov 19;12(1):19926. doi: 10.1038/s41598-022-23807-4. Erratum in: *Sci Rep.* 2023 Jan 3;13(1):102. PMID: 36402851; PMCID: PMC9675800. **\*co-correspondence**

**IF: 4,6, SJR Indicator: D1**

## **A Ph.D. tézishez nem közvetlen kapcsolódó publikációk listája:**

- Guca E, Nagy GN, Hajdú F, Marton L, **Izrael R**, Hoh F, Yang Y, Vial H, Vértessy BG, Guichou JF, Cerdan R. Structural determinants of the catalytic mechanism of *Plasmodium* CCT, a key enzyme of malaria lipid biosynthesis. *Sci Rep.* 2018 Jul 25;8(1):11215. doi: 10.1038/s41598-018-29500-9. PMID: 30046154; PMCID: PMC6060094.

**IF: 4,011, SJR Indicator: D1**

- Molnár P, Marton L, **Izrael R**, Pálinkás HL, Vértessy BG. Uracil moieties in *Plasmodium falciparum* genomic DNA. *FEBS Open Bio.* 2018 Sep 29;8(11):1763-1772. doi: 10.1002/2211-5463.12458. PMID: 30410856; PMCID: PMC6212640.

**IF: 1,959, SJR Indicator: Q2**

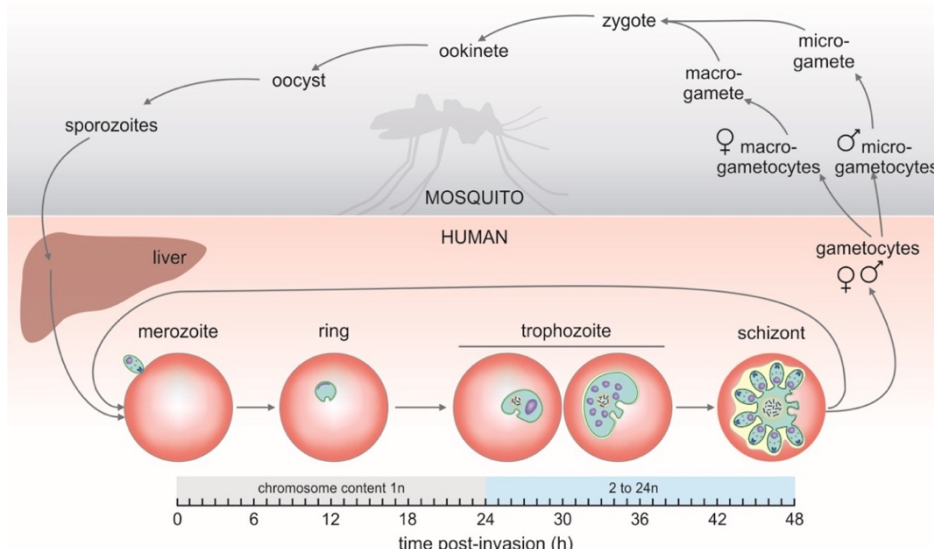
- Molnár P, Orbán Á, **Izrael R**, Babai R, Marton L, Butykai Á, Karl S, Vértessy BG, Kézsmárki I. Rapid and quantitative antimalarial drug efficacy testing via the magneto-optical detection of hemozoin. *Sci Rep.* 2020 Aug 20;10(1):14025. doi: 10.1038/s41598-020-70860-y. PMID: 32820190; PMCID: PMC7441145.

**IF: 4,38, SJR Indicator: D1**

## BEVEZETÉS

A több évtizednyi intenzív nemzetközi erőfeszítés ellenére, a malária továbbra is korunk egyik legnagyobb jelentőségű fertőző betegsége, amely közel 250 millió embert érint évente és több mint 650,000 halálesetet okozott 2022-ben, melynek 80%-a 5 alatti gyermek<sup>1</sup>. A betegséget az *Apicomplexa* törzsbe tartozó *Plasmodium* nemzetség parazitái okozzák, kiemelt jelentőséggel a *Plasmodium falciparum*, mely a halál esetek nagy részéért felel a szub-szaharai afrikai régióban. Az elmúlt években számtalan rezisztens törzs jelent meg az elsődleges védvonalnak számító artemizinin-alapú kombinációs terápiára<sup>2</sup>, így sürgős az új maláriaellenes gyógyszer mihamarabbi fejlesztése és új gyógyszercélpontok azonosítása.

A malária parazita egy több gazdaszervezetet érintő komplex életciklussal rendelkezik, amely két részre bontható: a szexuális életciklusra az *Anopheles* szúnyogban, illetve a klinikai jelentőségű aszexuális élet ciklusban az emberi szervezetben. A szúnyogcsípését követően, a szúnyog gyomorüregéből sporozoita állapotú paraziták kerülnek a bőralatti kapillárisokban, ezen keresztül pedig eljutnak az első fejlődési stádiumhoz, a májba. A májban található hepatociták fertőzését követően körülbelül egy héten át inkubálódnak, majd több mint 10,000 merozoita szabadul ki és fertőzi meg a vörösvértestek, elkezdve a tünetekkel járó vörösvértesten belüli életciklust (1. ábra).



1. ábra A *Plasmodium* paraziták komplex életciklusa<sup>37</sup>.

A vörösvértesten belüli életciklus a gyűrűs morfológiával rendelkező ring stádiummal kezdődik. Ez a szakasz analóg a sejtciklus G1 fázisával, amikor is a parazita felhalmozza a nyomkövetkező DNS replikációhoz szükséges tápanyagokat<sup>3,4</sup>. A szükséges tápanyagok elsődleges forrása a hemoglobin, mely temérdek mennyiségben elérhető a vörösvértesteken

belül. 24 óra elteltével, a ring stádiumú paraziták trofozoitákká fejlődnek, amiben a DNS replikáció java zajlik le. A trofozoita fázis során körülbelül 16 óra leforgása alatt a parazita genomja akár 32 kópiában is replikálódik, amely temérdek mennyiségű alapanyagot és jól koreografált élekciklust igényel a genomi integritás megőrzése érdekében. Végül az utolsó 8 órában a trofozoitában keletkezett új sejtmagok elkezdnek szétválni és schizont formává fejlődni. Az így keletkezett merozoita leány sejtek végül a ciklus végén kiszabadulnak és újra kezdik az élekciklust.

A nagymennyiségű sejtosztódás és intenzív proliferáció nagy mennyiségű prekursor metabolit szintézisét igényli. Legfőbb jelentőséggel többek között a foszfolipid (PL) membránok<sup>5-7</sup> és nukleinsavak<sup>8-10</sup> bírnak, melyek előállítása létfontosságú a gyors osztódás fenntartásához, így potenciális jó maláriaellenes gyógyszerként szolgálnak<sup>11</sup>. Tézisemben foszfolipid bioszintézis kulcs aspektusait, illetve a DNS alkotó nukleotidok metabolizmusára fókuszálok, hogy jobban megértsem ezek működését és gyógyszer fejlesztési lehetőségeit.

A vörösvértesten belüli élekciklus során a paraziták nagy mennyiségű foszfolipid bioszintézist igénylik, hogy az új membránstruktúrák ellátását biztosítani tudják. Fertőzés követően, a vörösvértetek teljes lipid tartalma 35%-ról 60%-ra nő, mely mutatja mekkora léptékű membrán bioszintézisre van igényük. A membránok legfőbb alkotója a foszfatidilkolin (PC), amely a teljes PL tartalom 45-55%-át adja<sup>6</sup>. Mivel a vörösvértetekben nem történik foszfolipid bioszintézis, a paraziták teljes mértékben a *de novo* bioszintetikus útvonalukra vannak utalva, amely esszenciális a vörösvörösvértesten belüli élekciklus során<sup>12,13</sup>. Korábban egy kolin analóg vezérmolekulához, az albitiazoliumhoz nagy remények fűződtek maláriaellenes gyógyszerfejlesztésben, azonban II. klinikai fázisban elbukott rossz farmakokinetikai tulajdonságai miatt<sup>14</sup>.

A PL metabolikus útvonal vagy Kennedy útvonal számos összefonódó lépésből áll, amely lehetővé teszi a különböző PL molekulák egymásba történő átalakulását<sup>15</sup>. A tézis fókuszpontjában álló PC bioszintézis számos metabolikus úton történhet. A PC alkotó kolin főforrása a lizofoszfatidilkolin (LysoPC) vagy tiszta kolin (Cho) a véráramból. Ezt követően a kolin a kolin kináz (CK) enzim foszforilálja és foszfo kolin (P-Cho) keletkezik belőle. A második és egyben folyamat sebességmeghatározó lépését a CTP:foszfo kolin citidililtranszferáz (CCT) enzim katalizálja, amely a P-Cho-ból CDP-kolint (CDP-Cho) készít egy CTP konjugációjával, miközben pirofoszfát szabadul fel melléktermékként. A CCT enzim kulcsfontosságú jelentőséggel bír a PC bioszintézis szabályozásában, ezért

kiemelt jelentősége van maláriaellenes gyógyszer célpontként és a jelen tézis egyik fő témája. Végül a CDP-Cho-ból a membrán kötött kolin-etanolamin foszfo-transferáz (CEPT) enzim gyárt PC-t egy diacil-glicerinnel (DAG) történő konjugációt követően.

A kulcsfontosságú *Pf*CCT enzim sebességmeghatározó mivoltából adódóan fontos

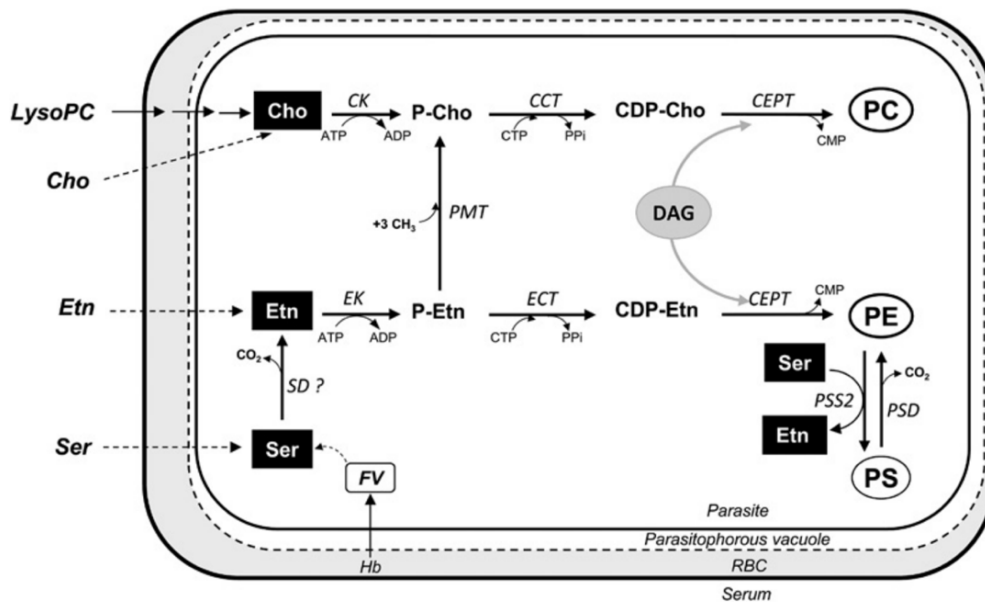


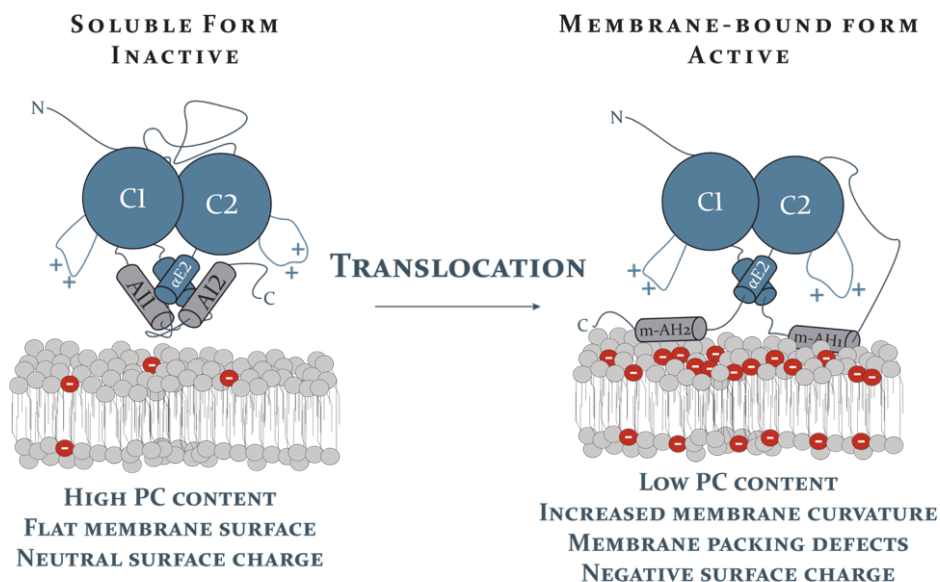
Figure 2. *Plasmodium falciparum* paraziták foszfolipid bioszintetikus útvonalai.<sup>15</sup>

megérteni annak egyedi strukturális és szekvenciális különbségeit magasabbrendű ortológ CCT fehérjékhez képest. A legtöbb eukarióta CCT fehérje homodimer, azonban a *Pf*CCT egy ún. pseudo-heterodimer, mely azt jelenti, hogy a dimer mindkét alegységét egy polipeptid láncon tartalmazza. Ez a fehérje egy génduplikációs esemény következménye, így a két alegység nagyon hasonló. A monomerek egy katalitikus (C) és egy membránkötő doménből (M) épülnek fel, köztük pedig egy 200 aminosav hosszú régió található, amely összeköti a két ismétlődő egységet. Kulcs különbségek az eukarióta CCT fehérjékhez képest még továbbá az N-terminális nukleáris lokalizációs szignál (NLS) és a C-terminális foszforilációs hely hiány, melyek egyike sem azonosított a *Pf*CCT fehérjében.

A fehérje szabályozása egy ún. transzlokációs mechanizmuson keresztül történik. Inaktív állapotban a fehérje szolubilis formában található, ahol az M doménben található autonhibíciós hélix kötődik a katalitikus aktivitásban fontos  $\alpha E$  hélixhez, így gátolva az aktivitását.<sup>16,17</sup> Alacsony PC tartalmú membrán felületek megjelenése azok fizikai-kémia tulajdonságai drasztikusan megváltoznak. A lecsökkent PC tartalom következtében megnő a negatív felületi töltés, amely taszításhoz vezet a poláris fejek között és membránképzési defektusok keletkeznek, illetve megnő a membrán felszíni görbülete<sup>18-20</sup>. A CCT fehérje képes érzékelni

ezeket a membrán tulajdonságokat és konformációs változásokon megy keresztül az M doménben, ahol egy membrán-indukált amfipatikus hélix (m-AH) segítségével képes beágyazódni a membránba, miközben a katalitikus domén felszabadul a gátlás alól<sup>19,20</sup>. Kulcs különbség, hogy ez az m-AH hélix patkány és humán CCT esetén egy hosszú, folytonos hélix, még a parazita esetén két részre válik, egy rövidebb N-terminális (m-AH-N) és egy hosszabb C-terminális (m-AH-C) hélixre<sup>21</sup>. Ez magyarázatot adhat arra is, hogy a *PfCCT* miért mutat egy gyenge hatszoros aktivitás növekedést transzlokációt követően, míg az emlős CCT-k esetén akár 100-szorosa is lehet<sup>22</sup>. További különbség, hogy a domináns CCT izoforma eukarióta sejtekben a nukleáris CCT $\alpha$ /CCT1, azonban a *PfCCT* diffúz lokalizációt mutat késői stádiumokban és transzlokációs képességei még karakterizálásra várnak *in vivo*<sup>23</sup>.

Korábban előállításra került egy CCT mutáns kínai aranyhüvelyű petefészek CHO-MT58 sejt vonal kémiai mutagenézis útján<sup>24–26</sup>, melyről demonstrálták, hogy alkalmas CCT fehérjék karakterizálására, köztük a *PfCCT*-re is<sup>27</sup>. Egy az endogén CCT-ben található pontmutáció következményeképp, a CHO-MT58 sejt vonalat 37°C-ról 40°C-ra emelve annak kolin tartalma 90%-kal leesik 24 óra után, majd 48 óra után apoptózis indukálódik<sup>28</sup>, így egy tökéletes molekuláris biológiai eszköz CCT fehérjék karakterizálására az endogén CCT transzgenikus módosítása nélkül.



**Figure 3. A *PfCCT* fehérje. Feltételezett transzlokációs mechanizmusa.** Inaktív állapotban a katalitikus domének (C1 és C2, kék) a membránkötő doménben (M, szürke) található autoinhibíciós hélix (A) gátlása alatt állnak. Lecsökkent PC tartalom esetén, a C domén feloldódik a gátlás alól az M doménben bekövetkező konformációs változások következtében és a membrán-indukált amfipatikus hélixen (m-AH) keresztül dokkol a membránba.

A nukleotid metabolizmus egy másik bizonyított metabolikus útvonal, amely potenciális maláriaellenes gyógyszer-célpont. A nukleinsav bioszintézis esszenciális a gyors sejtosztódásban keletkező nagy mennyiségű DNS replikációhoz és RNS polimerizációhoz<sup>29,30</sup>, amelyhez a nukleinsav építőelemek, a dezoxinukleotid trifoszfátok (dNTP) és ribonukleotid trifoszfátok (NTP) kellő szintézise elengedhetetlen. A purin és pirimidin nukleotid bioszintézis alapjaiban eltérő. Míg a purin bioszintézis teljes mértékben a nukleozidok és bázisok mentőútvonalaira támaszkodik, addig a pirimidin metabolizmus az építőkövek *de novo* bioszintézisével valósul meg. Ennek fényében, a pirimidin metabolizmus hosszú ideje áll a gyógyszerfejlesztés célpontjában, számos jelenleg elérhető készítmény az esszenciális timidilát szintáz – dihidrofolát reduktáz (TS-DHFR) bifunkcionális enzimen keresztül hat<sup>30</sup>.

A purin metabolikus prekursorok a humán gazdaszervezet véráramából származnak, legfőképp adenzin, hipoxantin és xantin formájában. Adenzin nagy mennyiségben található a vérkeringésben, azonban a vörösvértestek intenzíven felhasználják a saját ATP alapú energia termelésükhöz. A foszforilált nukleotidokat a parazita a megfelelő transzporterek hiányában képtelen felvenni, így azoknak nukleozid vagy nukleobázis formájában kell elérhetőnek lenni. Általánosságban, a transzportot követően a nukleozidokat megfosztja purin nukleozid foszforiláz (PNP) a ribóz lánctól és a tiszta bázisok kerülnek felhasználásra foszforibozil konjugációját követően. Ezek soron következő foszforilációja és oxidációja vezet végül a megfelelő dNTP-khez és NTP-khez. Az oxidációt a ribonukleotid reduktáz (RNR) enzim komplex katalizálja, mely a nukleotid difoszfátot képes (NDP) képes deoxinukleotid difoszfáttá (dNDP) alakítani, mind purin, mind pirimidin nukleotidok esetén.

A pirimidin metabolizmus számos energetikailag drága molekula előállítását igényli, ugyanis a purin metabolizmussal ellentétben, a transzporterek nem tudnak pirimidin prekursorokat biztosítani a parazitának. Az útvonal mechanizmusát tekintve nagyon hasonlít az emberéhez, azonban a reakciókat katalizáló enzimek számos struktúrális egyediséget mutatnak, melyek ki lehet használni jövőbeli gyógyszerfejlesztés céljából.

Jelen kutatásom előtt nem állt rendelkezésre részletes karakterizálás a parazita dNTP tartalmának vizsgálatáról sem a vörösvértesten belüli élelciklus során, sem bármiféle gyógyszernyomás alatt. Az elérhető vizsgálatok mindegyike csak néhány metabolitra vonatkozik és a dNTP szintekben történő változás megértése elengedhetetlen annak megértésében, hogy a parazita hogyan képes rezisztenciát kialakítani gyorsan ezekre a gyógyszerekre, melyet emiatt szeretnék alaposan megvizsgálni tézisemben.



## CÉLOK

A jelen tézisben célom, hogy karakterizáljam a malária parazita, *Plasmodium falciparum* két kulcsfontosságú metabolikus útvonalát. A foszfolipid és nukleotid bioszintézis mind esszenciális a parazita gyorsan szaporodó életciklusához, ezért ideális útvonalak gyógyszerfejlesztési szempontból és megértésük nélkülözhetetlen a jövőbeli terápiás fejlesztéséhez, illetve újszerű gyógyszer-célpontok azonosításához.

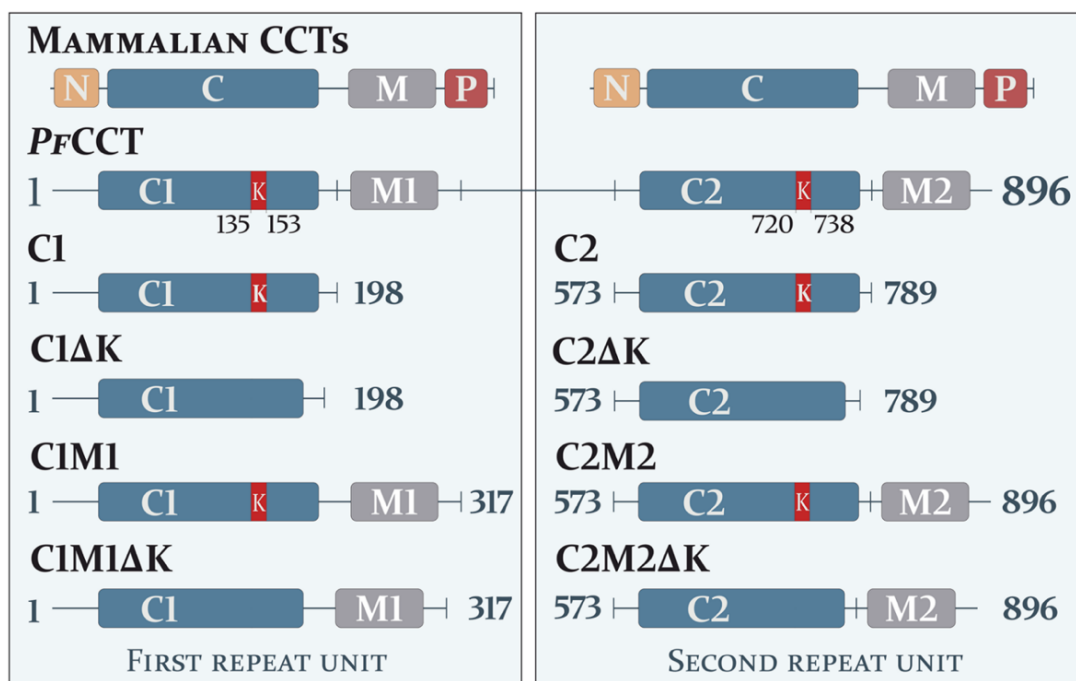
Elsőként szerettem volna azonosítani lényegi strukturális és szekvenciális különbségeket a foszfatidilkolin bioszintézisben szabályozó szereppel bíró CTP:foszfofolin citidililtranszferáz enzimben. Ehhez *in silico* módszerekkel megvizsgáltam a kulcs eltéréseket és azonosítottam egy feltételezett nukleáris lokalizációs szignált egy, a *Plasmodium* CCT-kre specifikus lizin-gazdag inzercióban. Továbbá kihasználtam a CHO-MT58 CCT-mutáns sejt vonal kínálati kísérleti lehetőségeket, hogy karakterizáljam az egyedi *Pf*CCT-beli elemek funkcionális jelentőségét a sejten belüli lokalizációt illetően. Végül analizáltam ezen strukturális elemek menekítési potenciálra gyakorolt hatását az első és második ismétlődő egység konstrukciók létrehozásával és a CHO-MT58 sejtbe történő tranziens transzfekcióval.

Másrészről utánajártam a purin és pirimidin metabolikus enzimek kifejeződésének időbeni lefutásának a vörösvértesten belüli életciklus során, melyhez adatbázisokban elérhető transzkriptom RNA-Seq adatkészletekből nyertem ki minőségi információt. Ezzel párhuzamosan mennyiségi meghatározást végeztem a parazita vörösvértesten belüli életciklusa során keletkező dNTP-k szintjeiről a főbb ring, trofozoita és schizont stádiumokban. Továbbá célom volt karakterizálni egy pirimidin metabolikus gyógyszer hatását a sejten belüli dNTP szintekre különböző koncentrációkban. Ehhez egy hatékony TS-DHFR inhibitor, a WR99210 nevű gyógyszert használtam, melyről korábban kimutatták, hogy az effektív koncentrációja a szub-nanomoláris tartományban van<sup>31</sup>. Utóbbi megfigyeléseim célja, hogy jobban megértsem miként járulhat hozzá a gyógyszer nyomás a gyors maláriaellenes gyógyszer rezisztenciához és a gyógyszerstressz okozta felborult nukleotid háztartás kritikus válaszokat tartogathat a problémát illetően.

## ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Elsőként, a PfCCT karakterizálásához *in silico* vizsgáltam a *Plasmodium*-specifikus szerkezeti elemeket. ClustalOmega segítségével többszörös fehérjeillesztést hajtottam végre, illetve SwissModellel homológia modellt generáltam a lizin-gazdag hurkot tartalmazó PfCCT katalitikus doménre a jelenleg elérhető PfCCT kristályszerkezet alapján<sup>32</sup>. A nukleáris lokalizációs szignál predikcióhoz egy *cNLSmapper* nevű predikciós szervert használtam.

Az azonosított egyedi szerkezeti elemek a CHO-MT58 CCT-mutáns sejtvonalonban kerültek karakterizálásra immunfluoreszcens-alapú kolokalizáció vizsgálattal és áramlási citometria alapú menekítési kísérletekkel CHO-MT58 sejteket transzfektáltam különböző M domén vagy lizin-gazdag hurok mentes ( $\Delta K$ ) mutáns konstrukciókkal (3. ábra). A kolokalizáció vizsgálatához Zeiss LSM 710 konfokális mikroszkópot használtam, mellyel 8-bites képeket készítettem, majd ezeket a Fiji Coloc 2 plugin segítségével elemeztem. A nukleáris lokalizációs koefficiens a Mander's-féle korrelációs koefficiens formulával számoltam:  $M = \frac{\sum_i S1_{i,coloc}}{\sum_i S1_i}$ , ahol  $S1_{i,coloc}$  megfelel a  $S1_i$  értékének, amely a CCT csatornájából származó intenzitás az adott pixelre, ha a sejtmagi jel egy előre meghatározott küszöbérték felett van.



3. ábra A vizsgált PfCCT konstrukciók sematikus ábrája. C (kék) és M (szürke) doboz utal a katalitikus és membránköti doménekre az első és második ismétlődő egységben.  $\Delta K$  utal a lizin-gazdag hurok eltávolítására, melyet bordó doboz jelöl. P (piros) és N (narancs) mutatja az N-terminális nukleáris lokalizációs szignált és C-terminális foszforilációs helyet az emlős CCT esetében.

Az menekítő képesség vizsgálatához tranziensen transzfektáltam CHO-MT58 sejteket, majd 3 napig inkubáltam őket a permisszív 37°C, illetve a restriktív 40°C hőmérsékleten. Ezt követően hozzáadtam 1 µg/ml propídium-jodidot (PI), amely a halott sejtek sejtmagi DNS-ét festi meg. A transzfekciós hatékonyság a fokozott zöld fluoreszcens fehérje (EGFP) jelének szűrésével került figyelembe vételre, amely a transzfektált plazmidon volt kódolva és egy belső riboszóma kötőhely segítségével függetlenül fejeződött ki a vizsgált konstrukciótól. A menekítési potenciál a következő matematikai formulával került kiszámításra:

$$\text{Menekítési potenciál (\%)} = \frac{\frac{\text{Összes sejt} - \text{PI}^+ \text{ sejtek}}{\text{Összes sejt}} \text{ 40}^\circ\text{C} - \text{on}}{\frac{\text{Összes sejt} - \text{PI}^+ \text{ sejtek}}{\text{Összes sejt}} \text{ 37}^\circ\text{C} - \text{on}} * 100$$

A nukleotid metabolikus enzimek transzkripció elemzéséhez a PlasmoDB adatbázisban elérhető ([plasmodb.org](http://plasmodb.org)) jó minőségű transzkriptom készletet vettem igénybe, mely Toenhake és munkatársai<sup>33</sup> által készített RNA-Seq adatból érhető el nyilvánosan. Az RNS expressziós értékek meghatározása FPKM (*fragments per kilobase exon per million of mapped reads*) relatív vonatkoztatott mennyiség segítségével történt.

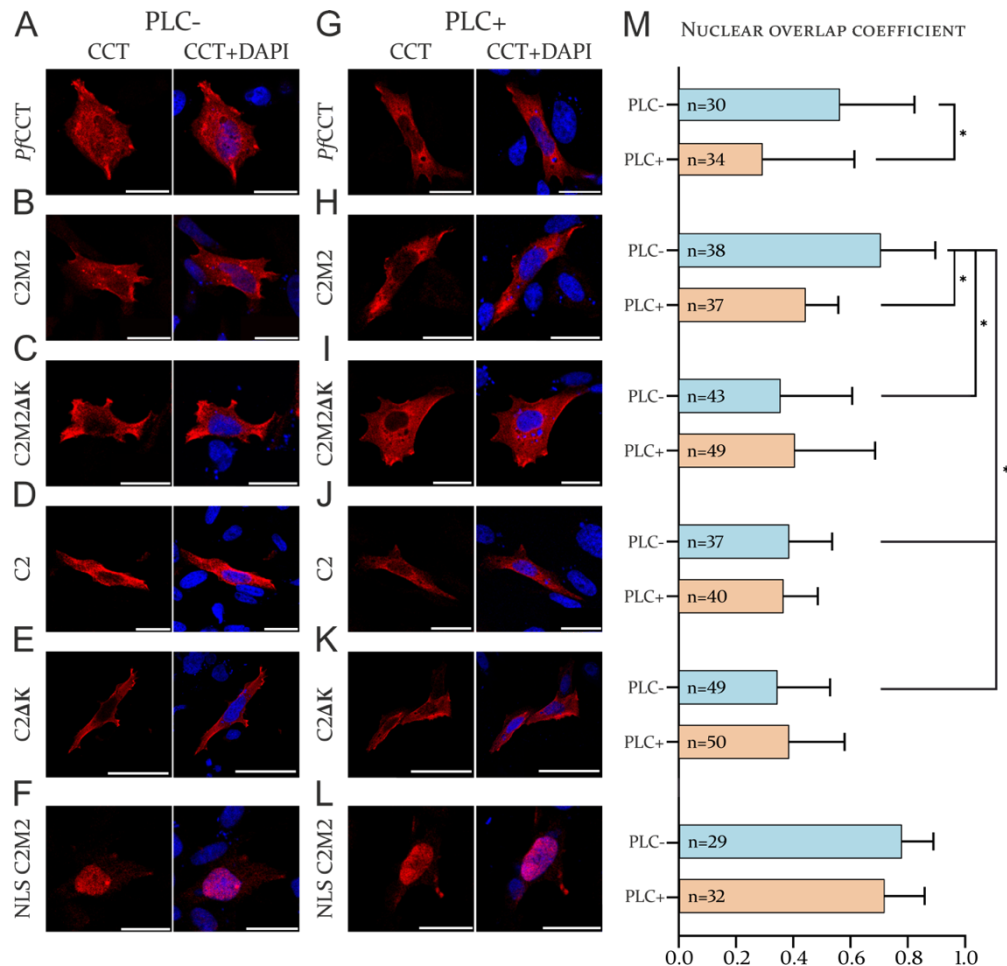
A teljes dNTP készlet izolálása dupla szorbitol szinkronizált *P. falciparum* 3D7 parazitákból történt ring (6-12 óra inváziót követően), trofozoita (30-36 óra inváziót követően) és schizont (42-48 óra inváziót követően) stádiumokból. Az izolálás minden minta esetén 300 µl vörösvértest pelletből történt. A WR99210-kezelt mintákat a második szinkronizálást követően három részre szedtem és a gyógyszert két koncentrációban (1 nM és 10 nM) teljes szérum tartalmú tápban hígítva hozzáadtam közvetlenül utána. A dNTP izolálás 24 órával a gyógyszer hozzáadását követően történt, a trofozoita állapotnak megfelelő stádiumban.

A dNTP izolátumok egy új fluoreszcens EvaGreen-alapú módszerrel kerültek mennyisége meghatározásra, melyet Purhonen és munkatársai<sup>34</sup> fejlesztettek ki. A módszer során egy 197-nukleotid hosszú szintetikus oligonukleotid templátot használtam, amelyben egy rövid primer kötőhelyet követően egyetlen dNTP detektáló hely van. Utóbbival szembe épül be a meghatározandó nukleotid és a templát többi része nem tartalmazza ezt a komplementer nukleotidot. A hosszú oligonukleotid templát célja, hogy több kettősszal kötő EvaGreen épüljön be, jel amplifikáció céljából. A módszer alapja, hogy az egyetlen dNTP detektáló hely limitálja a polimerizációt, így a keletkező új szálakból származó fluoreszcens jel egyenesen arányos lesz a meghatározandó nukleotid mennyiségével.



lokális QMEAN érték alapján erősen flexibilis, így feltehetően szerepe van egyéb fehérjékkel vagy az M doménnel történő kölcsönhatásokban. NLS predikció során a régiót egy gyenge kettős NLS motívumnak találtam egy 5.8-as becslés értékkel. Továbbá, az M doménben további két hasonló erősségű NLS motívumot azonosítottam.

A NLS funkció ellenőrzéséhez immunfluoreszcencia alapján kolokalizációs vizsgálatot hajtottam végre (5. ábra). Azt találtam, hogy az M domén és/vagy a lizin-gazdag hurok ( $\Delta K$ ) csonkított konstrukciók esetén csökkent a sejtmagi fluoreszcencia jele. Emellett megvizsgáltam, hogy milyen transzlokációs képességekkel rendelkeznek a különböző konstrukció foszfolipáz C (PLC) kezelést követően, amely PC hiányos membránok létrehozásával indukálja a transzlokációt. A PLC kezelés a teljes hosszúságú és második ismétlődő egység C2M2 konstrukció esetén egyaránt csökkent sejtmagi jelet mutatott, bizonyítva annak transzlokációs potenciálját.



**5. ábra** Különböző PfcCT konstrukciók sejtmagi kolokalizáció vizsgálata CHO-MT58 sejtekben. Konfokális mikroszkópiával készített képek a teljes hosszúságú PfcCT (A), a második ismétlődő egység C2M2 (B), a lizin-gazdag hurok mentes C2M2 $\Delta K$  (C), az M domén csonkított (D), a dupla csonkított C2 $\Delta K$  (E) and SV40 NLS-jelölt C2M2 constructs (F) és a megfelelő PLC kezelt mintákról (G-L). A sejtmagi kolokalizációs koefficiens Fijivel került ki számításra (\* $p < 0.001$ ). Az oszlopokban jelzett szám a figyelembe vettek sejtek számát jelöli.

A különböző csonkított *PfCCT* konstrukciók *in vivo* hatását a CHO-MT58 sejtek tranziens transzfekciójával vizsgáltam. A menekítési potenciál meghatározásához áramlási citometriát használtam, összevetve a permisszív 37°C és restriktív 40°C hőmérsékleten növesztett sejtek élősejt számát. Az esszé során azt találtam, hogy a lizin-gazdag hurok nem bizonyult esszenciálisnak a CHO-MT58 sejtek menekítésében egyik ismétlődő egység esetén sem (6. ábra). Továbbá, az M domén is nélkülözhető az *in vivo* aktivitás során, amely összhangban van a korábban megfigyelt M domén csonkított konstrukciók konstitutív aktivitásával *in vitro*. Végül azt is megmutattam, hogy a humán *HsCCT* is képes menekíteni a CHO-MT58 sejteket és felhasználható a jövőben további karakterizálásra.

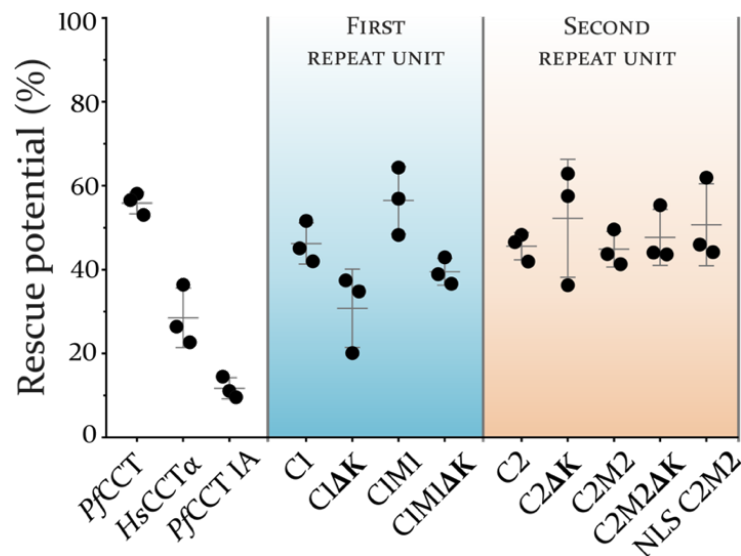
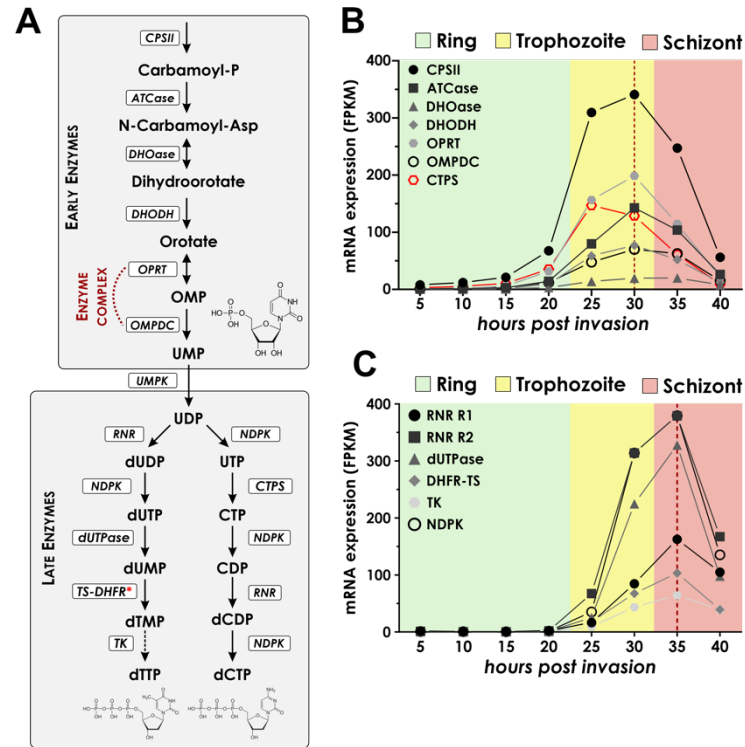


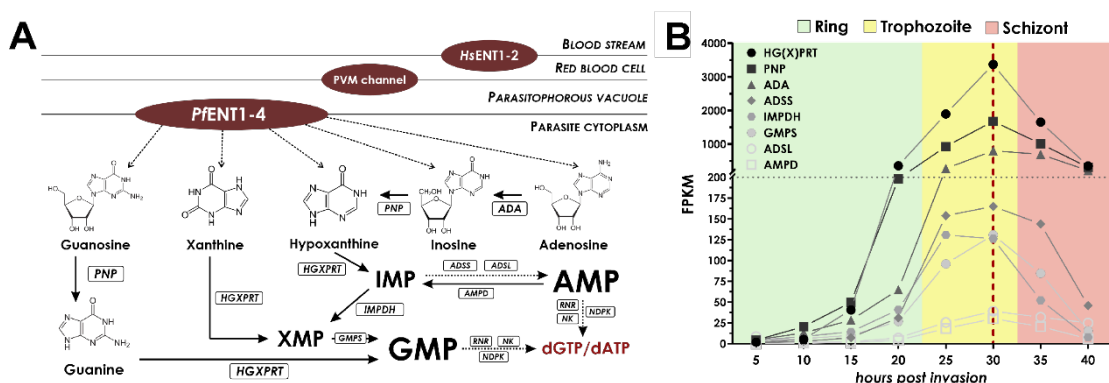
Figure 6. Különböző *PfCCT* konstrukciók menekítési potenciáljának vizsgálata a termoszenzitív *CCT*-mutáns CHO-MT58 sejtvonalonban. Minden eredmény három ismétlés átlagából és szórásából adódik.

A pirimidin bioszintézis a karbamoil-foszfát előállításával kezdődik, melyet a karbamoil-foszfát szintáz II enzim katalizál, amely az egyik legnagyobb mennyiségben expresszált fehérje a nukleotid metabolikus enzimek között (7. ábra). Az útvonal ezt követően lineáris halad tovább az UMP szintéziséig, amely közös prekuzora mind a dezoxicitidin-trifoszfátnak (dCTP), mind a timidin-trifoszfátnak (dTTP). Az UMP szintézise után az útvonal elágazódik, hogy ezen nukleotidok valamelyikét előállítsa. A transzkriptom elemzés során az enzimek két különböző halmazba sorolhatók aszerint, hogy az UMP-hez vezető útban vesznek részt vagy az azt követő elágazásban. A korai enzimek (30 órás csúcs fertőzést követően) és a késői enzimek (35 órás csúcs fertőzést követően) között egy 5 órás eltolódás figyelhető meg az expressziós maximumukban. Továbbá a korai enzimek esetén az expresszió már ring stádiumban elindul, amely nem figyelhető meg a késői enzimek esetén.



**Figure 8. Pirimidin metabolikus enzimek transzkripciós elemzése** A) *P. falciparum* parazita pirimidin metabolikus útvonala. Korai (B) és késői (C) pirimidin bioszintetikus enzimek transzkripciós profilja. CPSII – karbamoil-foszfat szintáz II, ATCase – aszpartát transzkarbamoiláz, DHOase – dihidroorotáz, DHODH – dihidroorotát dehidrogenáz, OPRT – orotát foszforiloziltranszferáz, OMPDC – OMP dekarboxiláz, RNR – ribonukleotid reduktáz, NDPK – nukleotid difoszfat kináz, CTPS – CTP szintáz, TS-DHFR – timidilát szintáz-dihidrofolat reduktáz, TK – timidilát kináz

Purin nukleotid bioszintetikus enzimek esetén egy, a korai pirimidin metabolikus enzimek expressziós profiljához hasonló trend figyelhető meg, ahol az expressziós maximum 30 órával fertőzést követően éri el és ring stádiumban is mérhető már transzkripció. A összes vizsgált

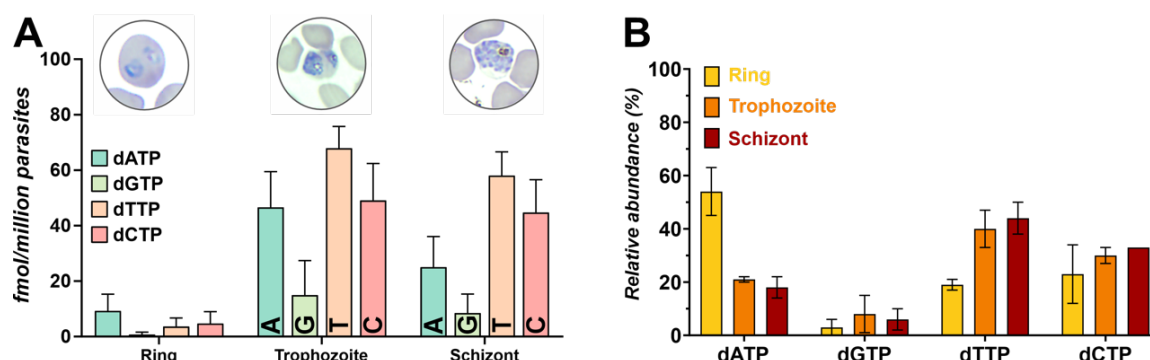


**Figure 7. Purin metabolikus enzimek transzkripciós elemzése.** A) *P. falciparum* parazita purin metabolikus útvonala. B) Purin bioszintetikus enzimek transzkripciós profilja. ENT – egyensúlyi nukleozid transzporter, PVM – parazita vakuólum membrán, ADA – adenzin dezamináz, ADSL – adeniloszukcinát liáz, ADSS – adeniloszukcinát szintáz, AMPD – AMP dezamináz, GMPS – GMP szintáz, HGXPRT – hipoxantin-guanin-xantin foszforiloziltranszferáz, IMPDH – IMP dehidrogenáz, NK – nukleozid kináz, NDPK – nukleotid difoszfat kináz, PNP – purin nukleozid foszforiláz



enzim közül a széles szubsztrát specificitással rendelkező hypoxantin-guanin-xantin foszforibozil transzferáz mutatja a legnagyobb mértékű expressziót, amely kulcsfontosságú minden purin nukleotid előállításában. Továbbá egy másik kulcs enzim, az RNR is hasonló mértékű expressziót mutat, amely fontos a purin és pirimidin bioszintézisben egyaránt, így ideális gyógyszer-célpont lehet a jövőben.

A dNTP molekulák akkumulációja a vörösvértesten belül már ring stádiumban megkezdődik, amely körülbelül 18 fmol teljes dNTP-t tartalmaz egy millió parazitára vonatkoztatva. Ebben a stádium a dATP található meg a legnagyobb mennyiségben, amely körülbelül  $54.4\% \pm 8.9\%$ -a a teljes dNTP mennyiségnek. Ezt szorosan követi a dTTP és dCTP szint  $23.1\% \pm 10.6\%$  és  $19.1\% \pm 1.9\%$  aránnyal. dGTP található meg a legkevesebb mennyiségben, csupán  $3.4\% \pm 2.9\%$ -át teszi ki a teljes dNTP készletnek. Ahogy a transzkriptom vizsgálat alapján várható, a dNTP készlet jelentősen megnő a trofozoita állapotra, amely közel 10-szeres növekedést mutat a 180 fmol teljes dNTP tartalmával millió parazitára vonatkoztatva. Az összetételben is drasztikus változás történik, ugyanis dATP helyett a dTTP teszi ki a teljes dNTP tartalom  $40.1\% \pm 6.5\%$ -át, melyet dATP és dCTP követ hasonló mennyiségben  $21.4\% \pm 1.3\%$  és  $30.1\% \pm 3.2\%$ -kal egyenként. Bár a dGTP szint nőtt, továbbra is legkisebb,  $8.4\% \pm 7.4\%$ -át teszi ki a teljes dNTP készletnek. Végül, a schizont stádium hasonló eloszlást mutat a trofozoita dNTP készlethez, de a teljes dNTP tartalom 140 fmolra csökkent egy millió parazitában. A relatív dTTP tartalom továbbra is legmagasabb  $3.5\% \pm 6.2\%$  értékkel, amit ismét a dATP és dCTP követ  $17.8\% \pm 3.8\%$  és  $32.8\% \pm 0.4\%$ -kal. A korábbiakhoz hasonlóan dGTP csupán a  $6.0\% \pm 3.7\%$ -át teszi ki a teljes dNTP tartalomnak, így ennek szintje marad végig a legalacsonyabb a teljes vörösvértesten belüli életciklusnak, utalva ennek limitáló szerepére.



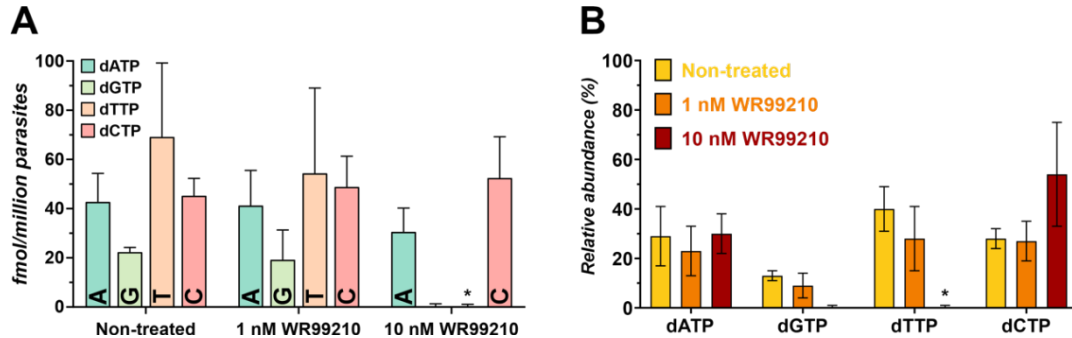
9. ábra dNTP szintek a vörösvértesten belüli életciklus különböző stádiumaiban.

Az abszolút (A) és relatív (B) mennyiségeket a triplikátumok átlag  $\pm$  S.E.M. értékei jelzi.

A pirimidin bioszintézist gátló gyógyszerek hatásának vizsgálata érdekében WR99210 adtam 1 nM és 10 nM koncentrációban szorosan szinkronizált ring kultúrához és 24 órán át



kezeltém őket. Érdekes módon, az alacsonyabb 1 nM WR99210 nem mutatott jelentős hatást annak szub-nanomoláris effektív koncentrációja ellenére, azonban köztudott hogy a gyógyszer leginkább a késői stádiumokban kezdi el kifejteni hatását, azonban ekkor már túl letális a vizsgálathoz<sup>36</sup>. A 10 nM WR99210 kezelt mintákban azonban egy erős hatást figyeltem meg, aminek eredményeként dTTP szint teljes mértékben lecsökkent a detektálási limit alá (10. ábra). Bár a dCTP és dATP szintje változatlan maradt, meglepő mód a dGTP szint szintén nullára csökkent, tovább erősítve annak fontos limitáló szerepét.



10. ábra dNTP szintek változása TS-DHFR inhibitor, WR99210 kezelés hatására.

Az abszolút (A) és relatív (B) mennyiségeket a triplikátumok átlag  $\pm$  S.E.M. értékei jelzi.

## ÖSSZEFOGLALÁS

Összefoglalva munkámat, az *in silico* vizsgálat felfedett *Plasmodium*-specifikus szerkezeti elemeket, melyek potenciálisan hozzájárulhatnak a sejten belüli lokalizációhoz. Eredményeim megmutatták, hogy mind a lizin-gazdag hurok, mind az M domén szükséges a sejtmagi lokalizációhoz a CCT-mutáns CHO-MT58 sejtvonalba. Továbbá azt is megmutattam, hogy foszfolipáz C-indukálta PC depléciónak hatására a PfCCT enzim képes transzlokációra. Végül, a menekítési kísérletek azt indikálják, hogy egyik egyedi strukturális elem sem esszenciális az CHO-MT58 sejtek menekítéséhez, amely egy hatékonyabb katalitikus mechanizmusra enged utalni.

Emellett megvizsgáltam a nukleotid metabolizmus időbeni lefolyását a parazita vörösvértesten belüli életciklus során. Transzkripciós elemzés segítségével feltártam egy érdekes eltolódást a korai és késői primidin metabolikus enzimek expressziós profiljában. Továbbá azt találtam, hogy a széles szubsztrát specificitással rendelkező enzimek kifejeződése a legmagasabb. A dNTP szintek mérése a transzkriptom elemzéssel összhangban azt mutatta, hogy a trofozoita állapotban a legmagasabb azok szintje és a dNTP összetétel jelentős változást mutat ring és a késői stádiumok között. A WR99210 kezelés hatására pedig a dTTP szintek mellett egy, a dGTP szintre gyakorolt hatás utal annak fontosságára a parazita életciklusban és ez hogyan járulhat hozzá a maláriaellenes gyógyszer rezisztencia kialakulásához.

## JELEN PH.D. ÉRTEKEZÉS TÉZIS PONTJAI

A jelen Ph.D. értekezés tézis pontjai a következők:

### Foszfolipid metabolizmus

- *In silico* karakterizáltam a teljes hosszúságú PfCCT és azonosítottam a lehetséges lokalizációra gyakorolt hatását a lizin-gazdag huroknak és M doménnek. Feltételeztem, hogy milyen szereppel bírhatnak a PfCCT transzlokációs mechanizmusát illetően és hogyan befolyásolhatja ez az *Apicomplexa* parazitákra jellemző egyedi szerkezeti elem a CCT fehérje szabályozódását.
- Konfokális mikroszkópia alapú kolokalizációs elemzéssel bebizonyítottam a lizin-gazdag hurok és M domén szerepét a sejtmagi lokalizációban. Emellett kimutattam a teljes hosszúságú és második ismétlődő egység transzlokációs képességét foszfolipáz C indukálta PC hiányos membrán megjelenése esetén.
- Megvizsgáltam, hogy milyen hatást gyakorol az egyedi *Plasmodium*-specifikus szerkezeti elemek eltávolítása a termoszenzitív CCT-mutáns CHO-MT58 sejtvonal menekítési képességére. Azt találtam, hogy a lizin-gazdag hurok és az M domén egyaránt elhanyagolható a 40°C-on történő menekítéshez *in vivo*. Emellett megmutattam, hogy a HsCCT $\alpha$  szintén képes menekíteni a sejtvonalat, bizonyítva a sejtvonal alkalmasságot egy nagyátersztőképességű PfCCT specifikus gyógyszerfejlesztési rendszer kialakítására.

### Nukleotid metabolizmus

- Összegyűjtöttem minőségi RNA-Seq transzkriptom adatkészleteket, mely alapján meghatároztam a purin és pirimidin bioszintézis időbeli lefolyásának dinamikáját a *Plasmodium falciparum* parazita vörösvértesten belüli életciklusa során, mely kulcs különbségeket tárt fel a késői és korai pirimidin metabolikus enzimek között.
- Megmértem a négy alapvető nukleotid szintjét a főbb vörösvértesten belüli ring, trofozoita és schizont stádiumokban, ahol azt találtam, hogy egy drasztikus 10x dNTP növekedés történik ring és trofozoita állapot között. A nukleotidok között a dTTP található legnagyobb mennyiségben, melyet dATP és dCTP követ hasonló szinttel, míg a dGTP szintje a legalacsonyabb végig.
- Megfigyeltem, hogy a TS-DHFR inhibitor, WR99210 jelentős hatást gyakorolt a várt dTTP szint mellett a dGTP szintjére is a 10 nM koncentrációban kezelt minták esetén 24 óra kezelést követően.

## REFERENCIÁK

1. World Health Organization. *World Malaria Report 2023*. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240086173> (2023).
2. Ward, K. E., Fidock, D. A. & Bridgford, J. L. Plasmodium falciparum resistance to artemisinin-based combination therapies. *Curr Opin Microbiol* **69**, 102193 (2022).
3. Lee, A. H., Symington, L. S. & Fidock, D. A. DNA Repair Mechanisms and Their Biological Roles in the Malaria Parasite Plasmodium falciparum. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **78**, 469–486 (2014).
4. Matthews, H., Duffy, C. W. & Merrick, C. J. Checks and balances? DNA replication and the cell cycle in Plasmodium. *Parasit Vectors* **11**, 1–13 (2018).
5. Wengelnik, K. *et al.* A Class of Potent Antimalarials and Their Specific Accumulation in Infected Erythrocytes. *Science (1979)* **295**, 1311–1314 (2002).
6. Gulati, S. *et al.* Profiling the Essential Nature of Lipid Metabolism in Asexual Blood and Gametocyte Stages of Plasmodium falciparum. *Cell Host Microbe* **18**, 371–381 (2015).
7. Vial, H. J., Eldin, P., Tielens, A. G. M. & van Hellemond, J. J. Phospholipids in parasitic protozoa. *Mol Biochem Parasitol* **126**, 143–154 (2003).
8. María Belén Cassera. Purine and Pyrimidine Pathways as Targets in Plasmodium falciparum. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **23**, 1–7 (2011).
9. Frame, I. J., Deniskin, R., Arora, A. & Akabas, M. H. Purine import into malaria parasites as a target for antimalarial drug development. *Ann N Y Acad Sci* **1342**, 19–28 (2015).
10. Krungkrai, S. R. & Krungkrai, J. Insights into the pyrimidine biosynthetic pathway of human malaria parasite Plasmodium falciparum as chemotherapeutic target. *Asian Pac J Trop Med* **9**, 525–534 (2016).
11. Alam, A. *et al.* Novel antimalarial drug targets: hope for new antimalarial drugs. *Expert Rev Clin Pharmacol* **2**, 469–489 (2009).
12. Ancelin, M. L. *et al.* Potent inhibitors of Plasmodium phospholipid metabolism with a broad spectrum of in vitro antimalarial activities. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 2590–2597 (2003).
13. Wein, S. *et al.* Transport and pharmacodynamics of albitiazolium, an antimalarial drug candidate. *Br J Pharmacol* **166**, 2263–2276 (2012).
14. Wein, S. *et al.* High Accumulation and In Vivo Recycling of the New Antimalarial Albitiazolium Lead to Rapid Parasite Death. *Antimicrob Agents Chemother* **61**, (2017).
15. Wein, S. *et al.* Contribution of the precursors and interplay of the pathways in the phospholipid metabolism of the malaria parasite. *J Lipid Res* **59**, 1461–1471 (2018).
16. Huang, H. K. H. *et al.* The membrane-binding domain of an amphitropic enzyme suppresses catalysis by contact with an amphipathic helix flanking its active site. *J Mol Biol* **425**, 1546–1564 (2013).
17. Taneva, S. G. *et al.* Interdomain communication in the phosphatidylcholine regulatory enzyme, CCT $\alpha$ , relies on a modular  $\alpha$ E helix. *Journal of Biological Chemistry* **294**, 15517–15530 (2019).
18. Johnson, J. E., Xie, M., Singh, L. M. R., Edge, R. & Cornell, R. B. Both acidic and basic amino acids in an amphitropic enzyme, CTP:phosphocholine cytidyltransferase, dictate its selectivity for anionic membranes. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 514–522 (2003).
19. Chong, S. S. Y., Taneva, S. G., Lee, J. M. C. & Cornell, R. B. The curvature sensitivity of a membrane-binding amphipathic helix can be modulated by the charge on a flanking region. *Biochemistry* **53**, 450–461 (2014).

20. Cornell, R. B. Membrane lipid compositional sensing by the inducible amphipathic helix of CCT. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* vol. 1861 847–861 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2015.12.022> (2016).
21. Larvor, M.-P. *et al.* Characterization of the lipid-binding domain of the *Plasmodium falciparum* CTP:phosphocholine cytidyltransferase through synthetic-peptide studies. *Biochem. J* vol. 375 (2003).
22. Cornell, R. B. & Ridgway, N. D. CTP:phosphocholine cytidyltransferase: Function, regulation, and structure of an amphitropic enzyme required for membrane biogenesis. *Progress in Lipid Research* vol. 59 147–171 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2015.07.001> (2015).
23. Contet, A. *et al.* Plasmodium falciparum CTP:phosphocholine cytidyltransferase possesses two functional catalytic domains and is inhibited by a CDP-choline analog selected from a virtual screening. *FEBS Lett* **589**, 992–1000 (2015).
24. Esko, J. D. & Raetz, C. R. Autoradiographic detection of animal cell membrane mutants altered in phosphatidylcholine synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 5192–5196 (1980).
25. Esko, J. D., Wermuth, M. M. & Raetz, C. R. Thermolabile CDP-choline synthetase in an animal cell mutant defective in lecithin formation. *Journal of Biological Chemistry* **256**, 7388–7393 (1981).
26. Esko, J. D., Nishijima, M. & Raetz, C. R. Animal cells dependent on exogenous phosphatidylcholine for membrane biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **79**, 1698–1702 (1982).
27. Marton, L. *et al.* Heterologous expression of CTP: Phosphocholine cytidyltransferase from Plasmodium falciparum rescues Chinese Hamster Ovary cells deficient in the Kennedy phosphatidylcholine biosynthesis pathway. *Sci Rep* **8**, (2018).
28. Cui, Z. *et al.* A genetic defect in phosphatidylcholine biosynthesis triggers apoptosis in Chinese hamster ovary cells. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 14668–14671 (1996).
29. Hyde, J. Targeting Purine and Pyrimidine Metabolism in Human Apicomplexan Parasites. *Curr Drug Targets* **8**, 31–47 (2006).
30. Belen Cassera, M., Zhang, Y., Z. Hazleton, K. & L. Schramm, V. Purine and Pyrimidine Pathways as Targets in Plasmodium falciparum. *Curr Top Med Chem* **11**, 2103–2115 (2011).
31. Rieckmann, K. H., Yeo, A. E. T. & Edstein, M. D. Activity of PS-15 and its metabolite, WR99210, against Plasmodium falciparum in an in vivo-in vitro model. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **90**, 568–571 (1996).
32. Guca, E. *et al.* Structural determinants of the catalytic mechanism of Plasmodium CCT, a key enzyme of malaria lipid biosynthesis. *Sci Rep* **8**, (2018).
33. Toenhake, C. G. *et al.* Chromatin Accessibility-Based Characterization of the Gene Regulatory Network Underlying Plasmodium falciparum Blood-Stage Development. *Cell Host Microbe* **23**, 557-569.e9 (2018).
34. Purhonen, J., Banerjee, R., McDonald, A. E., Fellman, V. & Kallijärvi, J. A sensitive assay for dNTPs based on long synthetic oligonucleotides, EvaGreen dye and inhibitor-resistant high-fidelity DNA polymerase. *Nucleic Acids Res* **48**, e87–e87 (2020).
35. Nagy, G. N. *et al.* Evolutionary and mechanistic insights into substrate and product accommodation of CTP:phosphocholine cytidyltransferase from Plasmodium falciparum. in *FEBS Journal* vol. 280 3132–3148 (2013).
36. Murithi, J. M. *et al.* Combining Stage Specificity and Metabolomic Profiling to Advance Antimalarial Drug Discovery. *Cell Chem Biol* **27**, 158-171.e3 (2020).
37. Molnár, P., Marton, L., Izrael, R., Pálinkás, H. L. & Vértessy, B. G. Uracil moieties in Plasmodium falciparum genomic DNA. *FEBS Open Bio* **8**, 1763–1772 (2018).