

**Egy malária ellenes gyógyszercélpont,
a *Plasmodium falciparum*
CTP:foszfokolin citidililtranszferáz jellemzése**

Doktori disszertáció magyar nyelvű rövid összefoglalója

dr. Marton Livia

Genom Metabolizmus Kutatócsoport
Enzimológiai Intézet
Természettudományi Kutatóközpont
Magyar Tudományos Akadémia

Multidiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola
Általános Orvostudományi Kar
Szegedi Tudományegyetem

Témavezető: Prof. Dr. Vértessy G. Beáta

Szeged

2017

KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA

A disszertáció témájához közvetlenül kapcsolódó közlemények listája:

- I. Nagy GN, Marton L, Contet A, Ozohanics O, Ardelean L-M, Révész Á, *et al.* Composite Aromatic Boxes for Enzymatic Transformations of Quaternary Ammonium Substrates. *Angew Chemie Int Ed.* 2014;53: 13471–13476. doi:10.1002/anie.201408246b **IF: 11.261**
- II. Marton L, Nagy GN, Ozohanics O, Lábás A, Krámos B, Oláh J, *et al.* Molecular Mechanism for the Thermo-Sensitive Phenotype of CHO-MT58 Cell Line Harboring a Mutant CTP:Phosphocholine Cytidylyltransferase. *PLoS One.* 2015;10: e0129632. doi:10.1371/journal.pone.0129632 **IF: 3.057**

A disszertációhoz közvetlenül kapcsolódó közlemények kumulatív hatás tényezője: 14.318

A disszertáció témájához közvetve kapcsolódó közlemények listája:

- III. Nagy GN, Marton L, Krámos B, Oláh J, Révész Á, Vékey K, *et al.* Evolutionary and mechanistic insights into substrate and product accommodation of CTP:phosphocholine cytidylyltransferase from *Plasmodium falciparum*. *FEBS J.* 2013;280: 3132–48. doi:10.1111/febs.12282 **IF: 3.986**

A disszertációhoz közvetve kapcsolódó közlemények kumulatív hatás tényezője: 3.986

1. BEVEZETÉS

A malária még napjainkban is egyike a legsúlyosabb vektor által terjesztett betegségeknek, világszerte mintegy 2.75 milliárd ember él a betegség által sújtott területen¹. Az embereket fertőző parazita fajok közül a legtöbb maláriával összefüggésbe hozható halálesetért a *Plasmodium falciparum* felelős. A betegség eliminációjára irányuló megelőzési programok sikeresnek mondhatók, azonban a gyorsan terjedő gyógyszerrezisztencia^{2,3} egyre sürgeti az új támadáspontokat célzó malária ellenes szerek fejlesztését. A Plasmodium paraziták összetett életciklusuk során két gazdaszervezetben fejlődnek, az Anopheles szúnyogban, mint vektorban illetve az ember máj- és vörösvérsejtjeiben. A fertőzött vörösvérsejtben a paraziták membrán termelése jelentős mértékű, membránjaik jellemzően foszfolipidekből, azon belül is foszfatidilkolinból (PC) és foszfatidiletanolaminból állnak. A foszfatidilkolin bioszintézis legfontosabb útvonala Plasmodiumban a Kennedy útvonal⁴, amely három egymást követő kolin-kináz, CTP:foszfokolin citidililtranszferáz (CCT) és kolin/etanolamin foszfortranszferáz enzimek által katalizált lépésekből áll. A bisz-kvaterner ammónium kolin analóg vegyületek *in vitro* és *in vivo* kísérletek során igazolt malária ellenes hatása a Kennedy útvonalat, mint lehetséges gyógyszer-célpontot jelölte ki⁵. Így a *Plasmodium falciparum* CCT (PfCCT), mint az útvonal sebességmeghatározó lépése lehetséges gyógyszer-célpontként lép elő, aminek nyomán az enzim szerkezeti és funkcionális jellemzése szükségessé válik mind molekuláris mind sejt szinten.

A CCT (EC szám: 2.7.7.15) a *de novo* PC bioszintézis kulcsenzime. Az általa katalizált reakcióban kolin-foszfát (ChoP) és citidin 5'-trifoszfát (CTP) szubsztrátokból citidin 5'-difoszfokolin (CDPCho) közti termék és pirofoszfát (PP_i) keletkezik.

¹WHO. *World Malaria Report 2016*.

²Enjalbal, C. *et al. Anal. Chem.* **76**, 4515–21 (2004).

³Klein, E. Y. *Int. J. Antimicrob. Agents* **41**, 311–7 (2013).

⁴Sen, P., Vial, H. J. & Radulescu, O. *BMC Syst. Biol.* **7**, 123 (2013).

⁵Wengelnik, K. *et al. Science* **295**, 1311–4 (2002).

A legtöbb CCT enzim oldatban dimert képez, amit a konzervált RYVD dimerizációs motívum stabilizál⁶. Az enzim α/β Rossmann fold-dal rendelkező katalitikus doménjét az enzim szabályozásáért felelős membránköttő, illetve foszforilációs régió követi. Az enzim szabályozásában fő szerepet játszó reverzibilis membrán köttő mechanizmus felelős az enzim inaktív citoszolikus és aktív membránköttött állapotai közti finom hangolt átmenetért. Így a CCT, mint sebességmeghatározó enzim szabályozása lehetővé teszi a Kennedy útvonal foszfatidilkolin képző kapacitásának visszacsatoláson alapuló szabályozását.

A *de novo* PC bioszintézis létfontosságú a Plasmodium paraziták számára, amit az evolúciósan rokon, rágcsálókat fertőző *P.berghei* parazitákban elvégzett gén kiütéses kísérlet is igazolt⁷. A Plasmodium genom csak egyetlen *cct* gént tartalmaz, amely duplikált katalitikus és membránköttő doméneket (CM domén) kódol. A duplikált CM doméneket összeköti egy mintegy 300 aminosav hosszú Plasmodium specifikus linker szakasz így képezve a 896 aminosavból álló teljes hosszúságú PfCCT fehérjét. A génduplikáció tényén túl azonban egyéb szerkezeti eltérések is vannak a parazita és emlős CCT-k között, ami megfelelő malária ellenes célponttá teheti a fehérjét.

A génduplikáció miatt a teljes hosszúságú fehérje kifejeztetése *in vitro* ezidáig sikertelen volt. Azonban a sejtes környezetben végzett kísérletek lehetőséget adhatnak a teljes fehérje vizsgálatára. A CHO-MT58 sejtvonal egy irányított kémiai mutagenézissel előállított kínai aranyhörcsög petefészek sejtvonal. A CCT enzimek funkcionális vizsgálatára alkalmas eszközként is jellemzett sejtvonal endogén *cct* génjében található pontmutáció hatására termoszenzitív fenotípust mutat⁸. Míg 37°C-on funkcióképes, bár kevesebb endogén CCT képződik, 40°C-on az enzim felgyorsult degradációja drasztikusan csökkent PC szinttel és morfológiai változásokkal jellemezhető sejthalálhoz vezet. Habár a sejtvonalat gyakran használják a CCT hiány és az apoptózis összefüggéseinek tanulmányozására, a termoszenzitív fenotípus

⁶Lee, J., Johnson, J., Ding, Z., Paetzel, M. & Cornell, R. B. *J. Biol. Chem.* **284**, 33535–48 (2009).

⁷Déchamps, S., Shastri, S., Wengelnik, K. & Vial, H. J. *Int. J. Parasitol.* **40**, 1347–65 (2010).

⁸Sweitzer, T. D. & Kent, C. *Arch. Biochem. Biophys.* **311**, 107–16 (1994).

molekuláris mechanizmusának feltárására irányuló *in vitro* tanulmány ezidáig nem készült. Mivel a CHO-MT58 sejtvonalt menekíthető külső PC forrás biztosításával, a hőmérséklet 37°C-ra történő visszaállításával vagy CCT enzim heterológ expressziójával, a sejtvonalt potenciálisan alkalmas lehet CCT ortológok funkcionális jellemzésére sejtes környezetben az endogén enzim hatásának tetszőleges kizárásával.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Jelen disszertációban egy lehetséges malária ellenes gyógyszer-célpont a *Plasmodium falciparum* CTP:foszfofolin citidililtranszferáz enzim *in vitro* és sejtes környezetben történő karakterizálást tűztem ki célul. Ennek megfelelően, a következő kérdéseket kívántam megválaszolni:

1. Mi a szerepe a *Pf*CCT kolin kötő zsebét felépítő aminosavaknak az enzim katalitikus és ligandum kötő mechanizmusában?
2. Mi a CHO-MT58 sejtvonalt termoszenzitív fenotípusát magyarázó pontos molekuláris mechanizmus?
3. Képes-e a *Pf*CCT heterológ expressziója menekíteni az emlős CHO-MT58 sejtvonalt 40°C-on?
4. Hogyan lehetséges egy jól használható sejtes teszt rendszer felépítése a parazita és emlős CCT-k közötti szerkezeti különbségek vizsgálatára?

3. KÍSÉRLETI MÓDSZEREK

Az *in vitro* kísérletekben használt *PfCCT*₍₅₂₈₋₇₉₅₎ konstrukciót és mutánsait a korábban kísérletesen jellemzett *PfCCT*₍₅₂₈₋₇₉₅₎ (pET15b) katalitikus domén konstrukcióból kiindulva készítettem el. Helyspecifikus mutagenezisre a QuikChange módszert használtam. Az oligonukleotidok szintézisét és a különböző konstrukciók szekvenciájának ellenőrzését az Eurofins MWG GmbH végezte. A sejtes kísérletekben használt teljes hosszúságú *PfCCT* konstrukciók előállításához az eredeti cDNS egyedi restriktációs helyekkel kiegészített, újra szintetizált változatát használtam a pIRES-puro-EGFP emlős expressziós vektorban.

A His-címkével ellátott *PfCCT*₍₅₂₈₋₇₉₅₎ vad típusú fehérjét, valamint a mutáns variánsok expresszióját BL21 (DE3) Rosetta *E. coli* expressziós rendszerben végeztem és Ni-NTA affinitás kromatográfiával tisztítottam 20 mM HEPES pH 7.5 100 mM NaCl-ot tartalmazó pufferben. A tömegspektrometriai mérésekben használt mintákat méretkizárásos kromatográfiával tovább tisztítottam a GE Healthcare ÄKTA rendszer segítségével.

Az enzimatis aktivitás mérésére egy folytonos, csatolt pirofoszfátáz enzim rendszert alkalmaztam. A 20 °C-on inkubált reakció során pirofoszfátáz és purin nukleozid foszforiláz segédenzimek és 7-metil-6-tioguanozin szubsztrát segítségével kolorimetriásan detektáltam a keletkező foszfát mennyiségét 360 nm Specord 200 spektrofotométerrel. A hőinaktivációs kísérletekben a fehérje mintákat 15 percig inkubáltam különböző hőmérsékleteken (10°C-60°C) majd 20°C-on mértem az enzim aktivitásukat. A kinetikai adatokat Michaelis-Menten és kompetitív szubsztrát inhibíciós egyenletekkel illesztettem az Origin 8.6 verziószámú programban.

Izotermális titrációs kalorimetria (ITC) méréseket MicroCal-ITC 200 kaloriméteren (Malvern) végeztük 20°C-on. A fehérje komplexek tömeg spektrometriai méréseit elektropray ionizációs feltétellel felszerelt Waters QTOF Premier készülékkel végeztük pozitív ion módban. A tömegspektrumokat a fehérje natív állapotában vettük fel.

A *PfCCT*₍₅₂₈₋₇₉₅₎ homodimer homológia modellek készítése során a patkány CCT katalitikus domén konstrukció 3 dimenziós szerkezete (PDB: 4MVC)⁹ szolgált alapul. A modellek a MODELLER 9.14 szoftver segítségével készültek. A modell adatai elérhetőek a protein modell adatbázisban (PMDB) a PM0079950 (*PfCCT*₍₅₂₈₋₇₉₅₎ WT) és PM0079951 (*PfCCT*₍₅₂₈₋₇₉₅₎ R681H) kódok alatt. A molekula dinamikai szimulációkat mindkét konstrukció esetében ugyanazokkal a paraméterekkel végeztük. A CHO-K1 és CHO-MT58 sejtvonalak 10% FBS-sel és 1% Penicillin-Sztreptomycin antibiotikummal komplettált F-12 tápoldatban 5% CO₂ atmoszférában 37°C vagy 40°C-on voltak fenntartva. A mikroszkópos kísérletek során a sejtek inkubációs hőmérsékletét a tranziens transzfekció után 72 órával emeltem meg 40°C-ra. 10 nap után a transzfektált és kontrollként szolgáló nem transzfektált sejteket fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltam. A fluoreszcencia aktivált sejtválogatás (FACS) kísérletek során a tranziensen transzfektált sejteket a transzfekciót követő 72-ik órában gyűjtöttem össze. A sejtek GFP pozitivitását (%) FACS Attune® Acoustic Focusing Cytometer (Blue/Violet) készülék segítségével vizsgáltuk. Az intakt sejtek populációját a forward scatter (FSC) és side scatter (SSC) paraméterek alapján határoztuk meg, míg a halott sejteket a propidium-jodid pozitivitásuk alapján zártuk ki.

⁹Lee, J., Taneva, S. G., Holland, B. W., Tieleman, D. P. & Cornell, R. B. *J. Biol. Chem.* **289**, 1742–55 (2014).

4. EREDMÉNYEK

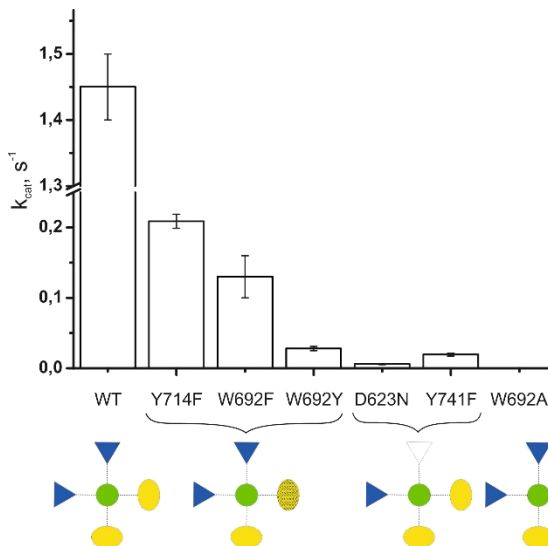
4.1. A P_fCCT kolin kötő zsebét felépítő különböző oldalláncok *in vitro* vizsgálata

A racionális alapokon nyugvó gyógyszertervezés megköveteli a lehetséges gyógyszercélpont fehérje aktív helyét felépítő aminosavak szerkezetének és kölcsönhatásainak mélyreható ismeretét. A P_fCCT homológia modell szerkezet vizsgálata során megállapítottam, hogy a P_fCCT enzim kolin kötő helye a CDPCho kvaterner ammónium molekularészletét részben hidrofób kölcsönhatásokkal rögzítő zseb. Az aktív helyet felépítő erősen konzervált oldalláncok közül a D623 és a Y741 elektrostatikus, míg a Y714 és W692 kation- π kölcsönhatásokat alakít ki a ligandummal. Ezen oldalláncok enzim katalízisben és az aktív hely felépítésében betöltött szerepének vizsgálatára pont mutáns konstrukciók sorozatát hoztam létre. A különböző P_fCCT₍₅₂₈₋₇₉₅₎ konstrukciókban a töltött (D623N, Y741F) és aromás (W692F, W692Y, Y714F) kölcsönhatópartnerek karakterét változtattam, vagy teljesen eltöröltem azt (W692A). A létrehozott mutációk negyedleges enzimszerkezetre gyakorolt indirekt hatását elektropray ionizációs tömegspektrometriával zártuk ki. A mutáns konstrukciók oligomerizációs állapota nem tért el jelentősen a vad típusú enzim monomer:dimer arányától. Az enzim kinetikai vizsgálatok arra utaltak, hogy a töltött/töltést nem hordozó aminosav cserék súlyos zavart okoznak a katalitikus hatékonyságban, amit valószínűleg főleg a kolin koordináció megváltozása okoz (ld. K_{M,ChoP} értékek az 1. táblázatban)

1. táblázat P_fCCT₍₅₂₈₋₇₉₅₎ vad típusú és mutáns konstrukciók kinetikai paramétereit. ND: alacsony enzim aktivitás miatt nem meghatározható.

Enzim	k _{cat} s ⁻¹	K _{M,CTP} μM	K _{M,ChoP} mM	rel. k _{cat} /K _{M,CTP}	rel. k _{cat} /K _{M,ChoP}
WT	1.45 ± 0.05	168 ± 17	1.8 ± 1.1	1	1
Y714F	0.21 ± 0.01	575 ± 60	10.2 ± 1.1	0.042	0.026
W692F	0.13 ± 0.03	890 ± 380	7.5 ± 2.4	0.018	0.022
W692Y	0.03 ± 0.003	191 ± 64	1.3 ± 0.2	0.017	0.029
D623N	0.006 ± 0.001	457 ± 191	13.1 ± 3.1	0.0015	0.00057
Y741F	0.019 ± 0.002	786 ± 175	8.5 ± 2.0	0.0028	0.0028
W692A	6 · 10 ⁻⁴	ND	ND	ND	ND

Ezzel szemben, amikor a kation- π kölcsönhatásban részt vevő oldallánc aromás karakterét részben megtartottam, például csak az aromás gyűrű elektrosztatikai tulajdonságait, a gyűrű méretét és kvadrupol momentumát változtattam, az enzim katalitikus képessége valamennyire megmaradt. A mutánsok kinetikai analízise alapján tehát a töltött és kation- π karakterű kölcsönhatások megkülönböztethetők és megállapítható, hogy a töltött kölcsönható partnerek meghatározó szerepet játszanak a kolin molekularészlet kötésében (1. ábra). A 692-es pozícióban lévő a CDPCho kvaterner ammónium molekularészlete felé néző triptofán oldallánc hozzájárulásának további vizsgálatához alanin mutagenézist alkalmaztam. Az α B hélixszel és L5 hurokkal is kölcsönhatásban lévő W692 oldallánc az aktív hely szerkezeti felépítésének stabilizálásában is részt vesz és aromás karakterének eltörlése drasztikusan lecsökkenti az enzim aktivitását.



1. ábra *PfCCT* aktív hely mutációk hatása a katalitikus hatékonyságra (k_{cat}). A színes sematikus ábrák a végrehajtott módosítások jellegét mutatják be (sárga ellipszis: kation- π kölcsönhatás, kék háromszög: töltött interakciós partner, zöld kör: kvaterner ammónium molekularészlet).

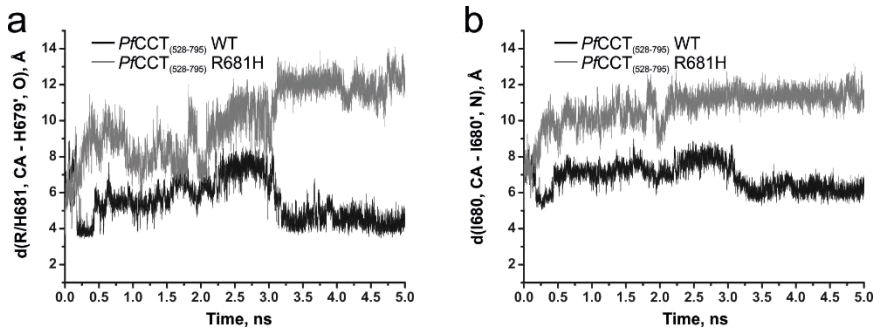
4.2. A mutáns CCT enzimet tartalmazó CHO-MT58 sejtvonaltermoszenzitív fenotípusa mögött meghúzódó molekuláris mechanizmus

Az indukálható módon CCT hiányos CHO-MT58 sejtvonaltermoszenzitív fenotípusért egyetlen az endogén *cct* génben azonosított mutáció tehető felelőssé. Az R140H aminosav változás érinti a *Rn*CCT dimerizációjában igazoltan alapvető fontosságú ¹⁴⁰RYVD¹⁴³ motívumot első aminosavát. A motívum konzerváltságát *in silico* kétszáz különböző evolúciós klaszterből származó CCT szekvencia összehasonlításával elemeztem. A korábban valószínűsített magas konzerváltság beigazolódott: a motívum első aminosavának bázikus karaktere (R/K), míg a második pozíció aromás karaktere (Y/W) jól meghatározott. A *Pf*CCT₍₅₂₈₋₇₉₅₎ dimer láncok közötti kölcsönhatásainak vizualizálására a patkány CCT kristály szerkezet alapján létrehozott homológia modellben a patkány szekvenciának megfelelő ⁶⁸¹RWVD⁶⁸⁴ motívumhoz kapcsolódó atomi távolságokat tanulmányoztam a vad típusú és a mutáns enzim esetén. Összesen 13 alegységek közötti kölcsönhatás biztosítja a dimer stabilitását a vad típusú *Pf*CCT második katalitikus domén szerkezeti modellben. Az R681H mutáció *in silico* modellje alapján a fent említett kölcsönhatások fele elvész, ami a dimer állapot stabilitás csökkenésére utalhat.

Az *in vitro* vizsgálatokhoz létrehozott *Pf*CCT₍₅₂₈₋₇₉₅₎ R681H mutáns konstrukció funkcionalitása nem sérült a 20°C-on elvégzett Michaelis-Menten titrálásokból származó k_{cat} és K_M értékek alapján. Ezek az eredmények egyetértésben vannak a CHO-MT58 sejtvonalt esetén 37°C-on megfigyelt vad típusúhoz hasonló fenotípussal. A fehérje stabilitásának és funkciójának hőmérséklet függését 10°C-tól 60°C-ig terjedő skálán vizsgáltam. Az R681H variáns aktivitását 20 és 30°C között veszítette el, míg hasonló inaktivációs mintázat 40°C és 55°C között volt megfigyelhető a vad típusú enzim esetén. A fiziológiás hőmérséklet tartományban detektált számottevő különbség párhuzamba állítható a CHO-MT58 sejtvonalt termoszenzitivitásával.

Az R681 oldallánc dimerizációban betöltött szerepe és az R681H mutáns jelentősen megváltozott hőstabilitása arra utal, hogy a mutáció hatása talán a *Pf*CCT₍₅₂₈₋₇₉₅₎ R681H enzim oligomerizációs állapotának megzavarásán keresztül érvényesül.

ESI-MS analízissel megmutattuk, hogy míg a vad típusú enzim esetén a kísérleti körülményeknek megfelelő mennyiségű dimer volt jelen, addig a mutáns enzim esetén mintegy 20-szor alacsonyabb dimer:monomer arányt lehetett csak megfigyelni. Mindez megzavart dimer képződésre utal. További kísérletes bizonyítékot keresve a háttérben meghúzódó molekuláris mechanizmusra molekula dinamikai szimulációt végeztünk a vad típusú és mutáns enzimek homológia modelljein. A mutáns enzim esetén az átlagos láncok között kölcsönhatási energia 25%-kal csökkent a vad típusúhoz képest. Annak igazolására, hogy a megzavart kölcsönhatás kiinduló pontja az $^{681}\text{RWVD}^{684}$ konzervált motívum, két reprezentatív atom távolságát követtük a szimuláció során. A $d(\text{R}/\text{H681}, \text{CA} - \text{H679}', \text{O})$ atomi távolság azt a pontot jellemzi a szerkezetben, ahol a két monomer a legközelebb van egymáshoz, míg a $d(\text{I680}, \text{CA} - \text{I680}', \text{N})$ távolságot valószínűleg nem érinti az R681 aminosav mutációja, így kontrollként szolgál. Az első távolság karakterisztikus változása a mutáns és vad típus esetén alátámasztja a súlyosan megzavart lokális kölcsönhatásokat (2. ábra).



2. ábra Jellemző lánc közötti távolságok változása a *PfCCT*₍₅₂₈₋₇₉₅₎ WT and R681H konstrukciók MD szimulációja során.

4.3. A *PfCCT* heterológ expressziója menekíti a PC bioszintézis Kennedy útvonalában deficiens CHO sejteket

Az irodalomból ismert, hogy a 40°C-on tenyésztett CHO-MT58 sejtek az alacsony PC szint miatt sejtihalált szenvednek¹⁰, ami visszafordítható a patkány CCT heterológ expressziójával¹¹. Jelen tanulmányban célul tűztem ki a *Plasmodium falciparum* CCT menekítési képességének vizsgálatát 40°C-on tenyésztett CHO-MT58 sejtekben. A tranziensen transzfektált sejtek mikroszkópos analízise megmutatta, hogy a *PfCCT*₍₁₋₈₉₆₎, teljes hosszúságú fehérje heterológ kifejeztetése növeli a CHO-MT58 sejtek túlélőképességét a nem transzfektált kontrollhoz képest.

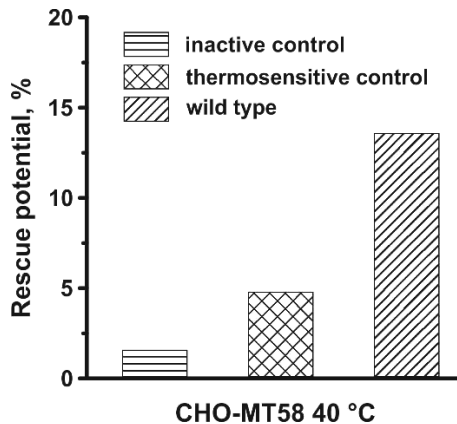
Egy egyszerű, a menekítés hatékonyságának tesztelésére alkalmas modell rendszer kifejlesztéséhez, megfelelő kontroll kísérletekre van szükség. Annak igazolására, hogy a citidililtranszferáz aktivitás felelős a sejtek túléléséért módosított *PfCCT* konstrukciókat terveztem. Az R140H mutációnak megfelelő hőérzékenyítő oldallánc cseréket hajtottam végre a teljes hosszúságú fehérje mindkét katalitikus doménjében. Egy másik pont mutáció a citidililtranszferázok között erősen konzervált HxGH motívumot célozta, azzal a céllal, hogy egy katalitikusan inaktív fehérje konstrukciót hozzak létre. A tervezett mutáció hatásának *in vitro* vizsgálatához a *PfCCT*₍₅₂₈₋₇₉₅₎ H630N mutáns kinetikai analízisét végeztem el. A mutáció súlyosan károsítja az enzim katalitikus hatékonyságát, mintegy három nagyságrendnyi aktivitás csökkenést okozva. Így feltételezhető, hogy a fent vizsgált hisztidin/aszparagin csere bevezetése mindkét katalitikus doménbe a *PfCCT* enzim egy katalitikusan inaktív formáját eredményezi.

Következő lépésként egy jól használható teszt rendszer létrehozását tűztem ki célul az egysejtű *PfCCT* emlős CHO-MT58 sejtvonalonban megfigyelt menekítési potenciáljának kvantitatív jellemzésére. Tranziens transzfekción átesett sejtek tenyésztési hőmérsékletét 24 h 37°C-os inkubáció után 40°C-ra emeltem, majd a transzfekciót követő 72-ik órában a sejteket FACS analízisnek vetettem alá. A különböző *PfCCT*

¹⁰Cui, Z. *et al. J. Biol. Chem.* **271**, 14668–71 (1996).

¹¹Sweitzer, T. D. & Kent, C. *Arch. Biochem. Biophys.* **311**, 107–16 (1994).

konstrukciók menekítési potenciálját a propidium-jodid negatív, vagyis élő sejtek aránya alapján számoltam a megfelelő kontroll kísérletekre vonatkoztatva. Eredményeim alapján, az inaktív *PfCCT* konstrukció transzfekeciója csak a sejtek 1.6%-át volt képes menekíteni. Valamivel magasabb százalékban (4.7%) éltek túl a hőérzékenyített *PfCCT*-vel transzfekektált sejtek, míg a sejtek 13.6%-a menekült meg a sejthaláltól a teljesen funkcionális *PfCCT*₍₁₋₈₉₆₎ tranziens transzfekeciója után (3. ábra). Habár a menekített sejtek százalékos arányát negatívan befolyásolja az általában alacsony transzfekeciós hatékonyság (5-15%), a majd a menekítési potenciál 9-szeres növekedése figyelemre méltó. Kísérleteim alapján tehát a *PfCCT* katalitikusan funkcionális és szerkezetileg ép formája szükséges a 40 °C-on működő CCT-vel nem rendelkező CHO-MT58 sejtek menekítéséhez.



3. ábra Különböző *PfCCT* konstrukciók menekítési potenciálja 40°C-on tenyésztett CHO-MT58 sejtekben.

5. ÉRTEKEZÉS

Az itt bemutatott kinetikai és ligandum kötési kísérletek mélyreható betekintést kínálnak a CCT enzimatiskus aktivitásában szerepet játszó kulcs fontosságú oldalláncok kölcsönhatásainak jellemzésébe. Jelen tanulmányban megmutattam, hogy a katalitikus mechanizmus során a kolin kötő zsebben az enzimatiskus funkciót kation- π és töltött kölcsönhatások közösen alakítják egy összetett aromás dobozt formálva. Számos példa ismert, melyben az aktív helyen lévő kvaterner ammónium iont az ún. aromás doboz ismeri fel. Ebben az esetben három vagy négy aromás gyűrű veszi körbe a ligandum töltött molekuláris részletét ezzel egy kivételesen erős ligandum kötést biztosítva. Ehhez képest az összetett aromás dobozban a kation- π kölcsönhatások mellett elektrosztatikus vagy töltött kölcsönhatások is jelentős szerepet játszanak a ligandum kötésében és a katalízisben. A létrehozott katalitikus domén pont mutáns konstrukciók eltérő viselkedése jól mutatja az aktív helyen lévő oldalláncok kölcsönhatásának aromás vagy töltött jellegét.

A CHO-MT58 sejt vonal termoszenzitív fenotípusának molekuláris mechanizmusát vizsgálva azt találtam, hogy az ép dimer képződés esszenciális a *PfCCT* enzimatiskus funkciójához. Ez a megállapítás egyetértésben van az irodalomban leírt evolúciósan rokon citidililtranszferázok, a CCT, CTP:glicerol-3-foszfát citidililtranszferáz (GCT) és CTP:etanolamin foszfát citidililtranszferáz (ECT) jellemző dimer felépítésével. Egy nemrégiben azonosított C-terminális citidililtranszferáz domén nélküli egér ECT szekvenciavariáns (splice variant) (*Pcvt2 γ*) teljes katalitikus inaktivitása tovább erősíti azt a hipotézist, hogy mindkét katalitikus domén szükséges az enzim aktivitásához.

Legjobb tudomásom szerint ezidáig a teljes hosszúságú *PfCCT* fehérje vizsgálatára irányuló kísérletek sikertelenek voltak. Jelen disszertációmban igazoltam, hogy a teljes hosszúságú *PfCCT*₍₁₋₈₉₆₎ heterológ expressziója képes megakadályozni a 40°C-on inkubált CHO-MT58 sejtek apoptózisát. Továbbá megmutattam, hogy a *PfCCT* enzimatiskus aktivitása felelős ezért a hatásért, mivel a katalitikusan inaktív *PfCCT* variáns transzfekciója nem okozott menekítési potenciál növekedést. Figyelembe véve, hogy a CCT hiánya letális számos élőlény esetében az itt bemutatott indukálható módon

CCT deficiens sejtes modell rendszer előnyös lehet más fajból származó CCT enzimek funkcionalitásának vizsgálatára, mivel az endogén CCT háttér aktivitása kizárható. A tervezett kísérletes rendszer a CCT enzimet támadó malária ellenes gyógyszerjelöltek szelektivitásának tesztelésére is alkalmas lehet.

6. A DOKTORI DISSZERTÁCIÓ TÉZISEI

A doktori disszertáció téziseit a következőképpen lehet összefoglalni:

1. A D623N és Y741 *Pf*CCT aktív hely oldalláncok a CDPCho kvaterner ammónium molekuláris részletének kötésében elektrosztatikus kölcsönhatásokkal vesznek részt és jelentős szerepük van az enzim katalízisben.
2. A kation- π kölcsönható partner W692 és Y714 oldalláncok aromás karakterének részleges megtartása valamennyire kompatibilis a katalízissel, míg a W692 oldalláncnak a katalízisben betöltött szerepén kívül hozzájárul az aktív hely szerkezeti stabilitásához is.
3. A konzervált *P. falciparum* RWVD dimerizációs motívum R681H mutációja közvetlenül nem befolyásolja az enzimaktivitást, de csökkent hőstabilitáshoz vezet, ami végül az enzim inaktivációját okozza.
4. *In vitro* és *in silico* eredményeim az R/H mutáció által okozott dimer kölcsönhatások gyengülésére utalnak. Ez alapján megállapítható, hogy az intakt dimer kölcsönhatások megléte létfontosságú a *Pf*CCT enzim aktivitásához.
5. Megmutattam, hogy a *Pf*CCT heterológ expressziója képes csökkenteni az apoptózist CHO-MT58 sejtekben 40°C-on. A kifejeztetett enzim funkcionalitásának fontosságát az inaktív *Pf*CCT konstrukció expressziójakor tapasztalható menekítés hiányával igazoltam.
6. A különböző *Pf*CCT konstrukciókkal transzfektált sejtek FACS analízisével meghatározható a menekítési potenciál, mint a transzfektált CCT enzim funkcionalitásának kvantitatív mérőszáma.

