

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

**A kalpain és a protein kináz/foszfatáz
rendszerek vizsgálata**

Kölcsönhatás a poszt szintetikus fehérje módosító rendszerek között

Kovács László

Témavezető: Dr. Dombrádi Viktor



Debreceni Egyetem

Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2010

1. TARTALOMJEGYZÉK

1. TARTALOMJEGYZÉK	2
2. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
3. BEVEZETÉS	5
3.1 Fehérjék poszttranszlációs módosítása	5
3.2 Fehérje foszforiláció és defoszforiláció	6
3.2.1 A protein foszfatázok csoportosítása	7
3.2.2 A protein foszfatáz Z (PPZ) jellemzése	9
3.3 Fehérjék limitált proteolízise	13
3.3.1 Kalpainok jellemzése	15
3.3.2 <i>Drosophila</i> kalpainok	19
3.3.3 Kalpain B	21
4. CÉLKITŰZÉSEK	23
5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	24
5.1 Anyagok	24
5.1.1 Vegyszerek	24
5.1.2 Tápoldatok, táptalajok	24
5.1.3 Pufferek, oldatok	25
5.1.4 Vektorok	25
5.1.5 Rekombináns fehérjék	25
5.1.6 Poliklonális kalpain B antitest	25
5.1.7 Oligonukleotid primerek	25
5.1.8 Biológiai minták	26
5.2 Módszerek	28
5.2.1 Tenyésztési eljárások	28
5.2.1.1 <i>Candida albicans</i> törzsek tenyésztése	28
5.2.1.2 Egyetlen sejtből létrehozott tiszta klónok tenyésztése	28
5.2.1.3 <i>Candida albicans</i> törzsek azonosítása	28
5.2.1.4 A <i>Drosophila</i> S2 sejtvonala fenntartása	28
5.2.2 Nukleinsav vizsgáló módszerek	29
5.2.2.1 Genomi DNS izolálása	29
5.2.2.2 Agaróz és poliakrilamid gélelektroforézis	29
5.2.2.3 Southern blot	29
5.2.2.4 Polimeráz láncreakció és klónozás	30
5.2.2.5 DNS szekvenálás	34
5.2.2.6 RFLP analízis	34
5.2.3 Fehérjevizsgáló módszerek	34
5.2.3.1 SDS poliakrilamid gélelektroforézis	34
5.2.3.2 <i>In vitro</i> és <i>in vivo</i> fehérje foszforiláció	34
5.2.3.3 Tömegspektrometria	36
5.2.3.4 Kalpain B aktivitásmérés	36
5.2.4 Immunológiai módszerek	37
5.2.4.1 Poliklonális kalpain B ellenanyag tisztítása	37
5.2.4.2 Dot blot	38
5.2.4.3 Western blot	38
5.2.4.4 Immunprecipitáció	38
5.2.5 Adatok elemzése, kiértékelése	39

6. EREDMÉNYEK	40
6.1 A <i>Drosophila melanogaster</i> kalpain B szabályozása foszforilációval	40
6.1.1 Rekombináns kalpain B <i>in vitro</i> foszforilációja	40
6.1.2 A kalpain B foszforilációs helyeinek lokalizációja	43
6.1.3 A foszforiláció hatása az enzim aktivitására és aktiválódására	44
6.1.3.1 Fluorimetriás mérés peptid szubsztráttal	44
6.1.3.2 Aktivitásmérés fehérje szubsztráttal	45
6.1.3.3 Autolízis vizsgálat	47
6.1.4 Mutáns kalpain B fehérjék vizsgálata	48
6.1.5 Kalpain B <i>in vivo</i> foszforilációja	50
6.2 A <i>Candida albicans</i> protein foszfatáz Z1 gén polimorfizmusa	53
6.2.1 A <i>C. albicans</i> PPZ gén azonosítása	53
6.2.2 A CaPPZ1 gén polimorfizmusa	53
6.2.3 A genetikai polimorfizmus szerkezeti vonatkozásai	55
6.2.4 Klinikai <i>C. albicans</i> izolátumok genotipizálása a CaPPZ1 gén hipervariábilis régiója alapján	57
7. DISZKUSSZIÓ	63
7.1 A <i>Drosophila melanogaster</i> kalpain B szabályozása foszforilációval	63
7.2 A <i>Candida albicans</i> protein foszfatáz Z1 gén polimorfizmusa	66
8. KONKLÚZIÓK	70
9. ÖSSZEFOGLALÁS	71
10. SUMMARY	72
11. IRODALOMJEGYZÉK	73
12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	82
13. PUBLIKÁCIÓS LISTA	83

2. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ATCC - American Type Culture Collection
BSA - borjú szérum albumin
bp - bázispár
CaMKII - kalcium/kalmodulin-függő protein kináz II
cDNS - komplementer DNS
cpm - beütés per perc (counts per minute)
dNTP - dezoxi-nukleozid-trifoszfát
DEAE - dietil-amino-etil csoport
DTT - ditio-treitol
EGF - epidermális növekedési faktor
EDTA - etilén-diamin-tetraecetsav
EGTA - etilén-glikol-bisz-(2-amino-metil-éter)-tetraecetsav
ERK - extracelluláris jel-regulált protein kináz
FBS - főtális borjúsérum
IPTG - izopropil- β -D-tio-galaktopiranozid
LC-MS - folyadékkromatográfia- tömegspektrometria
LY-AMC - N-szukcinil-Leu-Tyr-7-amino-4-metil-kumarin
MAP2c - mikrotubulushoz asszociált fehérje, 2c forma
OD - optikai denzitás
PBS - foszfáttal pufferolt sóoldat (phosphate buffered saline)
PBST - PBS + 0,01 % Tween
PKA - cAMP-függő protein kináz, protein kináz A
PMSF - fenil-metil-szulfonil-fluorid
PPZ - protein foszfatáz Z
RFLP - restrikciós fragmenthossz polimorfizmus
rpm - percenkénti fordulatszám
SDS - nátrium-dodecil-szulfát
PAGE - poliakrilamid gélelektroforézis
SOC - SOB (Super Optimal Broth) + 20 mM glükóz
SSC - nátrium-klorid, nátrium-citrát puffer oldat
St - standard
TCA - triklór-ecetsav
Tris - tris-(hidroxil-metil)-amino-metán
X-gal - 5-bróm-4-klór-3-indol- β -D-galaktozid

3. BEVEZETÉS

3.1 Fehérjék poszttranszlációs módosítása

A poszttranszlációs fehérje módosítások (PTM) olyan reakciók, amelyek során megváltoznak a fehérjékben lévő aminosav oldalláncok kémiai tulajdonságai. A módosítások a DNS-ben tárolt genetikai információ RNS-re, majd fehérjére történő átíródása után jönnek létre és hozzájárulnak a fehérjék szerkezetének és funkciójának sokféleségéhez. A Humán Genom Projekt legújabb adatai alapján a humán gének becsült száma 21000, a fehérjék száma mégis 300000 és 3000000 közé tehető (Walsh, 2005). Ahhoz, hogy a fehérjék száma több nagyságrenddel nagyobb legyen, mint amennyi a genomban kódolva van, mind az elsődleges mRNS alternatív szerkesztési mechanizmusa, mind a fehérjék poszttranszlációs módosítása hozzájárul.

A legtöbb fehérje kémiai változásokon megy keresztül a szintézisét követően, mielőtt elnyeri végleges funkcióját. A PTM növeli a fehérjék izoformáinak a számát, emellett olyan konformációk kialakulását teszi lehetővé, amely kedvez más fehérjék felismerésének, illetve különböző kölcsönhatások kialakításának. A módosítás képes szabályozni a fehérjék funkcióját azáltal, hogy megváltoztatja a fehérjék aktivációs állapotát és sejten belüli elhelyezkedését.

A poszttranszlációs módosításokat két nagy csoportba sorolhatjuk. Az egyik kategóriába tartozik minden olyan enzim által katalizált kovalens módosítás, amelynek során a fehérje egy vagy több aminosav oldalláncához valamilyen kémiai csoport adódik hozzá. Ilyen biokémiai funkció csoport lehet például az alkil, acetil, foszfát, glikozil csoport vagy éppen különböző lipidek és szénhidrátok.

A fehérjeszintézis után bekövetkező kovalens szabályozások másik nagy csoportjába sorolhatóak azok a mechanizmusok, amelyek során a fehérjék peptidkötéseinek hidrolitikus hasítása következik be proteázok vagy autokatalitikus hasítás révén.

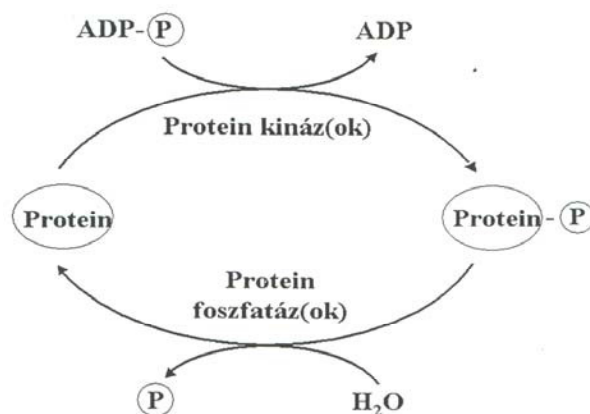
Elmondható tehát, hogy a poszttranszlációs módosítások központi szerepet játszanak a fehérjék heterogenitásának kialakításában és hozzájárulnak ahhoz, hogy ugyanazon fehérjék különböző sejt típusokban különböző feladatokat tudjanak ellátni.

3.2 Fehérje foszforiláció és defoszforiláció

A fehérjék reverzibilis foszforilációja az egyik leggyakoribb poszttranszlációs szabályozó mechanizmus, amely mind a prokarióta (Cozzone, 1988), mind az eukarióta (Chang és Stewart, 1998) szervezetekben előfordul. A foszforilációs reakciót a protein kinázok katalizálják, a foszforildonor ATP, ritkábban a GTP gamma-foszfátját kapcsolják a fehérjék szerin, treonin illetve tirozin oldalláncaihoz. A sejtek által termelt ATP körülbelül 20 %-a használandó fel a reakció során. Az eukarióta fehérjék aminosav oldalláncaihoz kapcsolható foszfát nagy része, mintegy 99%-a Ser illetve Thr és csupán kis része, kevesebb mint 1%-a kapcsolódik Tyr oldalláncokhoz (Ingebritsen és Cohen, 1983). A protein kinázok összessége a kinom, és becslések szerint a kinázok több mint 500 képviselője található meg a humán kinomban (Manning és mtsai, 2002).

A foszforiláció során az elektrosztatikus kölcsönhatások következtében megváltozik a fehérjék konformációja, amelyből kifolyólag a funkciójuk is módosulhat. Irodalmi adatok alapján ismert, hogy a fehérjék aktiválódása és gátlása is bekövetkezhet ezen poszttranszlációs módosítás eredményeképpen. Ismeretes, hogy a foszfátcsoport kapcsolódása után a fehérje alegységein belül kialakuló kapcsolatok miatt allosztérikus konformáció változás jön létre a glikogén foszforiláz enzim mindkét alegységében, aminek hatására megtörténik a fehérje allosztérikus aktivációja (Barford és mtsai, 1991; Johnson és Lewis, 2001). Ezzel ellentétben, amikor a foszforiláció során a citrát ciklusban szerepet játszó izocitrát dehidrogenáz inaktivációja következik be a fehérje aktív helyének közvetlen gátlása révén (Dean és Koshland, 1990).

A fehérjék reverzibilis foszforilációja szerepet játszik a sejtek energia metabolismusának, a sejtek osztódásának, növekedésének és differenciálódásának, mozgásának, valamint anyagcsere folyamatainak szabályozásában. Ez a poszttranszlációs módosítás ugyanakkor csak akkor képes regulációs szerepet betölteni a sejtek életében, amennyiben lehetőség nyílik a protein kinázok által beépített foszfát csoport lehasítására, tehát ha a folyamat megfordítható. A foszfátcsoport hidrolitikus eltávolítását protein foszfatázok katalizálják (1. ábra).



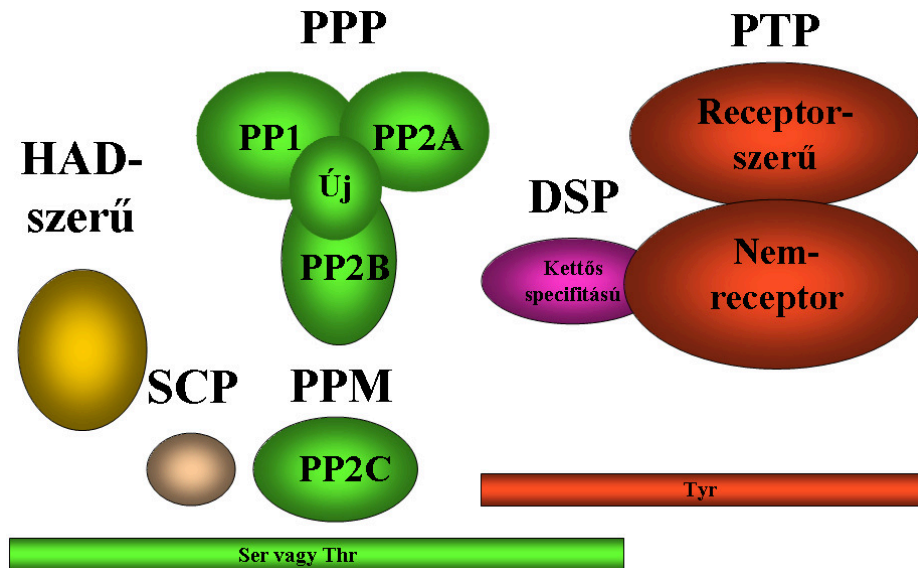
1. ábra. A fehérje foszforiláció és defoszforiláció mechanizmusa

A humán genom közel 150 foszfatázt kódol (Jackson és Denu, 2001). Ahhoz, hogy a foszforiláció megfelelőképpen tudja biztosítani a fehérjék szabályozását, a protein kinázok és protein foszfatázok működésének összhangban kell lennie, egyébként a fehérje túl- vagy éppen alul foszforilált állapotba kerülhet, ami a funkciójának elvesztéséhez vezetne. Nem meglepő tehát, hogy a szubsztrát fehérjék foszforiláltsági fokát ezen két nagy enzimescsoport aktivitásának az egymáshoz való viszonya határozza meg (Hunter, 1995).

3.2.1 A protein foszfatázok csoportosítása

A protein kinázok népes csoportot alkotnak, melynek minden tagja ugyanazon enzimeszaládba sorolható, mivel divergens módon alakultak ki. Ezzel szemben a protein foszfatázok száma jóval kevesebb, mégis több csoportba oszthatóak konvergens evolúciójuk következményeképpen (Cohen, 1997). A foszfatázok szubsztrát specificitásuk, reakciómechanizmusuk és aminosav szekvenciájuk alapján különálló csoportokba sorolhatóak (2. ábra). A foszfatázok egy része a fehérjék szerin és treonin oldalláncát defoszforilálja, a többi a fehérjék tirozin oldalláncát defoszforiláló családokba tartozik (Hunter, 1995). A humán genom által kódolt 150 foszfatáz mintegy 112 képviselője az utóbbi kategóriába tartozik (Almo és mtsai, 2007). Ezek mellett léteznek még a kettős specificitású foszfatázok (DSP), amelyek a fehérjék Ser/Thr és Tyr oldalláncairól is képesek a foszfátot lehasítani (Barford, 1995). A Tyr-specifikus foszfatázok (PTP) illetve kettős specificitású foszfatázok (DSP) közös jellemzője, hogy kétlépéses folyamatban, kovalens

tiofoszforil enzim intermedier képződése mellett végzik a defoszforilációt. A katalitikus reakcióban kitüntetett szerepe van az aktív centrumban elhelyezkedő cisztein aminosavnak, amely az összes PTP családtagban megtalálható konzervált motívumon belül helyezkedik el (Almo és mtsai, 2007).



2. ábra. Az eukarióta protein foszfatázok csoportosítása

(Dombrádi és mtsai, 2002 alapján)

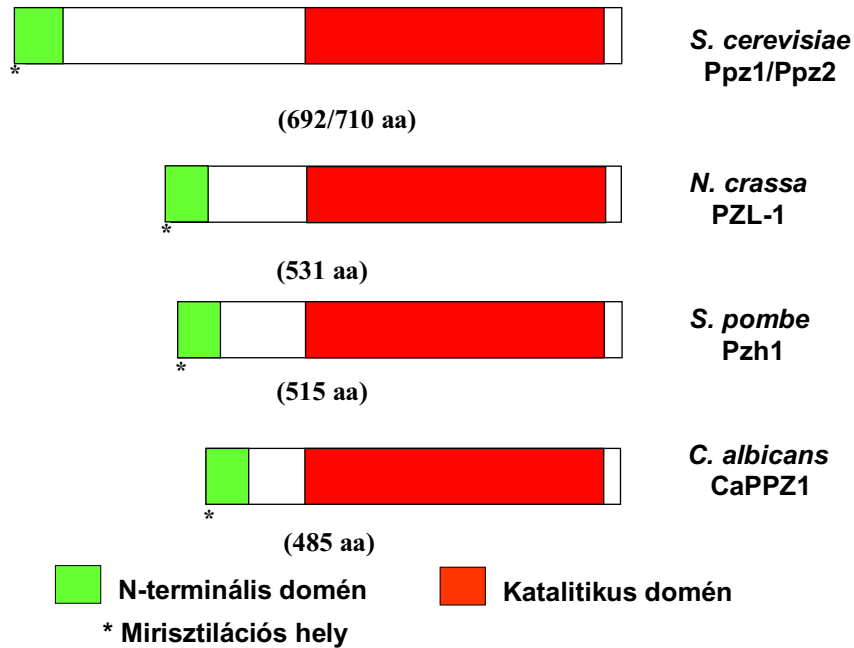
A Ser/Thr specifikus foszfatázok további alcsoportokra bonthatóak. Ide sorolhatóak a foszfoprotein foszfatázok (PPP), a fémion-függő protein foszfatázok (PPM), a haloacid dehalogenáz (HAD) szerű foszfatázok, valamint az RNS polimeráz II C-terminális régiójára specifikus foszfatázok (SCP) (Almo és mtsai, 2007). A PPP és PPM kategóriába tartozó enzimek közös jellemzője, hogy aktív centrumukban két fémiont tartalmaznak, amelyek segítségével képesek a fehérjék szerin vagy treonin oldalláncához kapcsolódó foszfátcsoporthoz hidrolizálni. Szekvencia hasonlóságuk alapján a PPP alcsoportba tartoznak a Zn/Fe tartalmú enzimek (PP1, PP2A és a PP2B), melyek elkülönítése eredetileg szubsztrát specifitásuk és hőstabil gátló fehérjékkel szembeni érzékenységük alapján történt (Ingebritsen és Cohen, 1983). Ide sorolhatóak még az új típusú protein foszfatázok is, amelyek szerkezetük alapján átmenetet mutatnak az előbb említett három csoport között (Cohen, 1997). A PPM csoportba tartozó PP2C aktivitása Mn^{2+}/Mg^{2+} függő. A HAD-szerű és az SCP foszfatázok a haloacid dehalogenáz szuperfamiliahoz

tartoznak, jellemző rájuk, hogy Mg^{2+} -függő módon a katalitikus helyen lévő aszpartát oldallánc közreműködésével végzik a defoszforilációt foszfo-aszparaginsav köztitermék keletkezése közben (Almo és mtsai, 2007).

3.2.2 A protein foszfatáz Z (PPZ) jellemzése

A Ser/Thr specifikus foszfatázok klasszikus biokémiai vizsgálatokkal történő besorolását követően, klónozási munkák eredményeképpen, egyre több olyan foszfatáz azonosítottak, melyek aminosavszekvenciája hasonlóságot mutatott a PP1, PP2A és PP2B enzimekéhez. Ezek a fehérjék a különbségek mértéke miatt önálló csoportot alkottak és az új típusú protein foszfatáz elnevezést kapták (Cohen, 1997). Közöttük számos olyan foszfatáz sikerült azonosítani magasabbrendű eukarióta szervezetekben, melyek homológjai gombákban is előfordulnak (Sit4, Glc7, Cdc14), ugyanakkor kimutattak csak gombákban előforduló specifikus foszfatázokat is (PPZ és PPG) (Arino, 2002).

Irodalmi adatok alapján ismert, hogy PPZ fehérjét *Saccharomyces cerevisiae*-ben a *PPZ1* és *PPZ2* (Posas és mtsai, 1992), a *Schizosaccharomyces pombe*-ben a *Pzh1* (Balcells és mtsai, 1997), *Neurospora crassa*-ban a *Pz11* (Szöör és mtsai, 1998), míg a *Candida albicans*-ban a *CaPPZ1* gén (Jones és mtsai, 2004) kódol. A géntermékek aminosav sorrendjének összehasonlítása után látható, hogy a fehérjék három jól elkülönülő részre bonthatóak (3. ábra). A C-terminális katalitikus domének (piros szakasz) valamint a fehérjék N-terminális (zöld rész) végén elhelyezkedő, kb. 50 aminosavból álló peptidszakaszok (*) nagyfokú hasonlóságot mutatnak mindegyik fehérjében, továbbá a katalitikus domének a PP1 katalitikus alegységéhez is nagymértékben hasonlítanak (Arino, 2002). Ennek következtében a PPZ fehérjéket az 1. típusú Ser/Thr foszfatázok közé sorolhatjuk. Az N-terminális domén többi része és a két domént összekötő szakasz (fehér rész) viszont különbözik a fehérjékben. A globuláris szerkezetű katalitikus domén az enzim aktivitásáért felel. Az N-terminális kb. 50 aminosavból álló rész a fehérje mirisztilálásához és membránhoz való kötődéséhez szükséges (Clotet és mtsai, 1996). A rendezetlen szerkezetű N-terminális régió regulációs szerepét igazolja az a tény, miszerint a külön expresszált katalitikus domén nagyobb aktivitással rendelkezik, mint a teljes hosszúságú fehérje (Posas és mtsai, 1995a; Vissi és mtsai, 2001). Ez azt sugallja, hogy az N-terminális domén gátolja a foszfatáz aktivitását.



3. ábra. A PPZ fehérjék aminosav sorrendjének összehasonlítása

(Vissi és mtsai, 2001 alapján)

A *S. cerevisiae* PPZ protein foszfatázok molekuláris biológiai és funkcionális jellemzése érdekében intenzív kutatómunka folyt. Kimutatták, hogy a PPZ fontos szerepet játszik a gombasejtek ozmotikus stabilitásának, sejt méretének és integritásának fenntartásában (Lee és mtsai, 1993, Posas és mtsai, 1993; Hughes és mtsai, 1993). A két PPZ gén inzerció inaktiválása a gombasejtek líziséhez vezetett, ez a hatás még kifejezettebb volt alacsony (5 mM) koffein koncentráció alkalmazása mellett, ugyanakkor a sejtek 1 M szorbitol jelenlétében túléltek (Posas és mtsai, 1993). A sejt felszintézisben a PPZ kölcsönhat a PKC által aktivált mitogén aktivált protein kináz (MAPK) útvonallal, ugyanis a Ppz1 vagy a Ppz2 túltermelése ellensúlyozza a *PKC1* (protein kináz C) és *MPK1* (mitogén aktivált protein kináz) mutáció hatására bekövetkező sejt lízist, ugyanakkor *PPZ1 PPZ2* deléció a Bck1 (bypass of C kinase), és Mpk1 túltermelése kompenzálja (Lee és mtsai, 1993).

A PPZ génnek fontos szerepe van a sejtek sóháztartásának szabályozásában (Posas és mtsai, 1995b). A *PPZ1 PPZ2* deléció hatására a sejtek megnövekedett Na^+ és Li^+ ion iránti toleranciát mutattak, ugyanis fokozódott a két ion kiáramlása. A *ppzΔ* mutánsokban megnőtt az *ENA1* gén által kódolt P-típusú Na^+ -ATPáz pumpa expressziója, míg a PP2B (kalcineurin) deléciója hatására csökkent sótolerancia mutatkozott az *ENA1* gén expressziójának

csökkenése miatt. Tehát a két foszfatáz együttesen, de ellentétes módon játszik szerepet a gombasejtek sóháztartásának szabályozásában.

Kiderült, hogy a Hal3 fehérje túltermelése kalcineurin-független módon növeli, ugyanakkor hiánya csökkenti a sejtek Na^+ és Li^+ ionnal szembeni toleranciáját, még hozzá az *ENA1* gén kifejeződésének szabályozása révén (Nadal és mtsai, 1998). PPZ hiányában a Hal3 túltermelése és a mutációja is hatástalannak bizonyult, ami kölcsönhatást sejtet a Hal3 fehérje és a Ppz fehérjék között. Bizonyították, hogy a Hal3 a Ppz1 negatív regulátora és a foszfatáz C-terminális katalitikus részéhez kötődve fejt ki gátló hatását.

Felismerték, hogy a PPZ-nek a sejtciklus szabályozásában is van szerepe (Clotet és mtsai, 1999). A Ppz1 túltermelése lassú sejtnövekedést eredményez, ugyanis a G1/S átmenet során gátlást fejt ki. A *SIT4* gén terméke a G1/S fázison való áthaladáshoz szükséges, mutációja miatt a sejtek szintén lassan nőnek. Ez a növekedési defektus a Hal3 túltermelésével helyreállítható. Továbbá kimutatták, hogy a *PPZ1* deléciója részben kivédi a *sit4Δ* mutáns lassú sejtnövekedését. Tehát igazolódott, hogy a Ppz1 és Sit4 foszfatáznak ellentétes hatása van a sejtciklus szabályozásában.

Kiderült, hogy a PPZ foszfatázok a fehérje transzláció szabályozásában is részt vesznek, még hozzá az elongációs faktor $1\text{B}\alpha$ (Tef5) foszforiláltsági állapotának befolyásolása révén. Az $\text{EF1B}\alpha$ *in vivo* körülmények között a Ser86 oldalláncon foszforilálódik. Kísérletes úton igazolták, hogy a *PPZ* gének deléciója és a *HAL3* fokozott expressziója a fehérje foszforilációjának növekedését eredményezi ugyanezen a helyen (Nadal és mtsai, 2001).

Újabb bizonyítékok azt mutatják, hogy a PPZ a K^+ -érzékenységet a Trk1/2 mediált K^+ transzport szabályozása révén végzi (Yenush és mtsai, 2002). A *PPZ* mutációja növeli a Trk rendszer aktivitását. Ennek következtében a plazma membrán depolarizálódik a káliumion felvétele miatt. Az intracelluláris káliumion koncentráció növekedése miatt megnő a sejten belüli nyomás, ami a sejt integritását veszélyezteti. Továbbá az ionegyensúly fenntartása végett a K^+ beáramlást H^+ kiáramlás követi, ez pedig intracelluláris pH növekedést okoz. A bekövetkező alkalikus sokk eredményeképpen megváltozik a gének expressziós szintje valamint a sejtciklus szabályozása is. 2004-es adatok szerint ezen felül a Ppz protein foszfatáz a Trk-független kis affinitású kálium influxot is szabályozza (Ruiz és mtsai, 2004).

A PPZ fenti funkcióinak ismeretében a *PPZ*-hiányos mutánsok viselkedése jól magyarázható a 4. ábra segítségével.



4. ábra. A PPZ aktivitás csökkenésének következményei

A hasadóélesztő *S. pombe* és a fonalas gomba *N. crassa* is kódol PPZ-szerű foszfatázokat a genomjában, amelyek N-terminális részükben különböznek egymástól (lásd 3. ábra). A *S. pombe* esetében megfigyelték, hogy a *pzh1* deléciója Na⁺ hipertoleranciát és K⁺ érzékenységet eredményez, és ezáltal szerepe van a sóháztartás szabályozásában (Balcells és mtsai, 1997). Azonban a mechanizmusa eltérést mutat a *S. cerevisiae* Ppz1-től. A *pzh1* hiánya következtében nem történik változás a nátrium és a lítium kiáramlásban, de csökken ezen kationok beáramlása, továbbá a mutáció redukálja a kálium kiáramlást (Balcells és mtsai, 1999). Komplementációs kísérletek során megfigyelték, hogy a Phz1 képtelen helyreállítani a Na⁺ toleranciát *S. cerevisiae* *ppz1Δ* mutánsban (Balcells és mtsai, 1997). Ezzel szemben, amikor *N. crassa* PZL-1 fehérjét *S. cerevisiae* *ppz1Δ* mutánsban expresszálták *PPZ1* promóterrel, az képes volt a mutáns törzs koffein és lítium ionnal szembeni megváltozott toleranciáját visszaállítani (Vissi és mtsai, 2001). Ezen felül a PZL-1 túltermelése csökkenti a *S. cerevisiae*-ben a *SLT2/MPK1* mitogén aktivált protein (MAP) kináz mutációja által okozott letalitást. Következésképpen az N-terminális régióban található eltérések ellenére a PPZ-szerű PZL1 foszfatáz képes teljesíteni minden jól ismert PPZ funkciót. A *C. albicans* PPZ1 szerepe eddig még nem ismert, de azt irodalmi adatok alapján tudjuk, hogy a diploid organizmusban a gén egyik (Xu és mtsai, 2007) vagy mindkét (Hanaoka és mtsai, 2008) alléljának kiütése nem

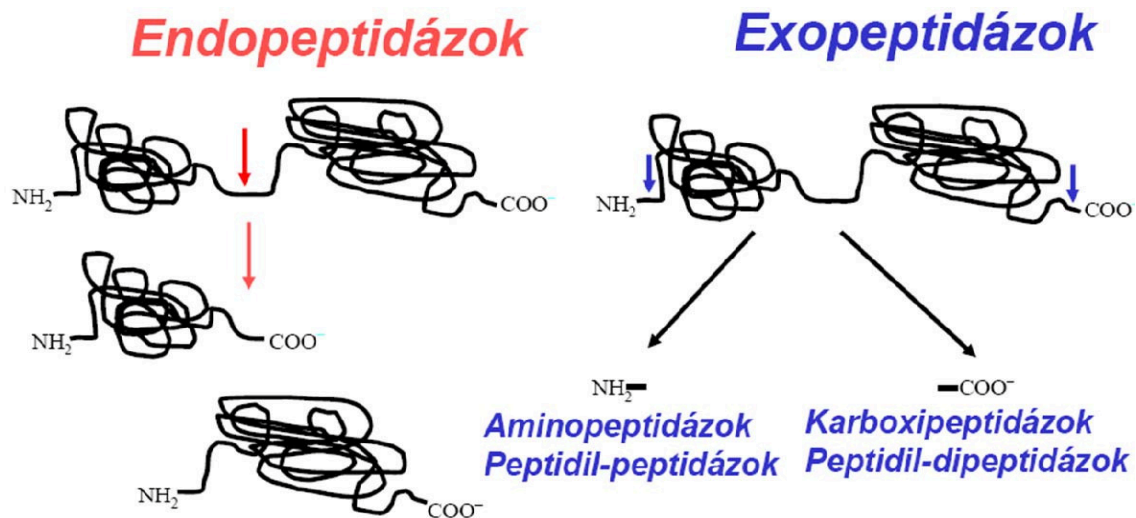
okoz letalitást. Munkánk során ezért a *C. albicans* protein foszfatáz Z1 gént szerettük volna tanulmányozni.

3.3 Fehérjék limitált proteolízise

A fehérjék poszttranszlációs kovalens módosításának másik nagy csoportjába tartozik a fehérjék irreverzibilis proteolízise. A folyamatot proteázoknak nevezett enzimek katalizálják, amelyeket a genom kb. 2%-a kódolja (Barrett, 2001). Amennyiben a fehérje teljes mértékben aminosavakra bomlik, teljes proteolízisről, degradációról beszélünk, ha azonban csak kitüntetett helyen/helyeken megy végbe a hasítás, akkor limitált proteolízisről van szó. A fehérjék peptidkötéseinek hidrolitikus hasítása lényeges eleme a homeosztázis fenntartásának, szabályozza a fehérje turnover dinamikáját (Creighton, 1993). A proteázok tulajdonképpen minden olyan fehérjét lebontanak, amelyek potenciálisan veszélyt jelentenek az élő sejtnak, mivel azonban fiziológiás körülmények között termodinamikailag és kinetikailag is irreverzibilis folyamatról van szó, aktivitásukat szigorú szabályozás alatt kell tartani. Kontrollálatlan proteolitikus aktivitás ugyanis apoptotikus sejthalálhoz vezethet (Walsh, 2005). Szabályozásuk történhet időben és térben egyaránt. Az időbeli szabályozásra jó példa a hasnyálmirigyben termelődő szerin proteázok esete. Ezek az emésztő enzimek inaktív proenzim formában (zimogén) szintetizálódnak, majd a felszabadulásuk helyén proteolitikus hasítás révén aktiválódnak. A térbeli szabályozás leggyakrabban kompartmentalizáció révén jön létre, jól tükrözi ezt a citoplazmától elzárva, a lizoszómákban található enzimek esete. Fontos sejten kívül lezajló térbeli kontroll mechanizmus a proteázok olyan fehérjékkel (inhibitorok) történő kölcsönhatása, amelyek gátolják működésüket.

Nagyszámú proteáz jellemzése megtörtént már (Rawlings és mtsai, 2005), osztályozásuk számos szempontból lehetséges. Az élő szervezetekben való előfordulásuk alapján léteznek extracelluláris, intracelluláris, lizoszómális vagy az emésztő traktusban előforduló proteázok. A polipeptidlánc hasítási helye alapján endopeptidázokat és exopeptidázokat különíthetünk el (5. ábra). Az exopeptidázok aminopeptidázokra és karboxipeptidázokra oszthatóak. Az endopeptidázok az aktív helyükön lévő aminosavak vagy kofaktorok, tehát katalitikus mechanizmusuk alapján csoportosíthatóak: lehetnek szerin- (tripszin, kimotripszin), cisztein- (papainok, kaszpázok, kalpainok), metallo- (kollagenázok, szekretázok) és aszpartát (pepszin) proteázok. A humán genom által kódolt

553 proteáz túlnyomó többségét (>90 %) besorolhatjuk ez utóbbi négy csoportba (Puente és mtsai, 2003).



5. ábra. Proteolitikus enzimek osztályozása

(Prof. Tózsér József engedélyével)

Az eukarióta sejtek fehérjekészletének nagy része átesik a limitált proteolízisen a normál érési folyamat során. Szemben az emésztő enzimekkel, melyeknek az a feladatuk, hogy teljes mértékben degradálják a táplálékban megtalálható fehérjéket, a szabályozó proteázok csupán limitált proteolízist hajtanak végre szubsztrátjaikon. Megváltoztatják a fehérjék térben való elhelyezkedését, aktivitását és életidejét, ezáltal befolyásolják a proteom összetételét és funkcióját. A limitált proteolízis egyik esete, amikor a szignál peptidáz nevű enzim az endoplazmatikus retikulum (ER) membránjához kötött riboszómákon szintetizálódó fehérjék N-terminális végén található szignál szekvenciát lehasítja (Paetzel és mtsai, 2002). A szignál szekvencia specifikusan az ER lumenébe irányítja a fehérjét. Ez az első lépés a fehérjék érése során, ezt követően a profehérje további átalakításokon fog átesni a Golgi apparátusban (Molloy és mtsai, 1999; Rockwell és mtsai, 2002). Előfordulhat, hogy a proteázok többlépcsős folyamat eredményeképpen határozzák meg a fehérjék sorsát. Jó példa erre a Notch protein érése, melynek során a fehérje négy gondosan időzített hasítás révén tölti be funkcióját (LaVoie és Selkoe, 2003). A limitált proteolízis kategóriájába tartozik még az autokatalitikus hasítás, mely specifikus, jól definiált peptidkötés/ek mentén megy végbe és a protein prekursor aktiválódásához vezet. Az érdeklődésünk középpontjában álló papain

szupercsaládba tartozó kalpainok is ezzel a mechanizmussal aktiválódnak, Ca^{2+} -jel hatására önmagukat hasítják N-terminális részükön és aktívvá válnak (Suzuki és mtsai, 1981).

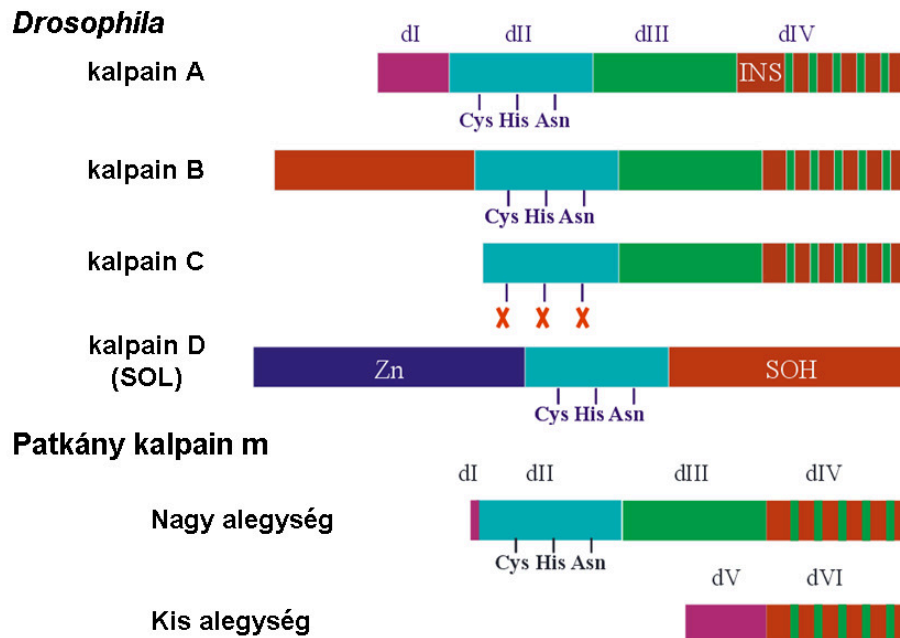
3.3.1 Kalpainok jellemzése

A kalpain Ca^{2+} -aktivált neutrális, citoplazmatikus cisztein proteáz (CANP), amelyet az 1960-as években írtak le először (Guroff, 1964). Patkányok agyából és vázizmából izolálták a fehérjét és megállapították, hogy katalitikus hatását nem lizoszómálisan, hanem a citoplazmában fejt ki, és optimálisan közel neutrális pH-n működik. A kalpain (kalcium aktivált papain) elnevezést később kapta, amikor is felismerték, hogy szerkezetében a papain-szerű cisztein proteáz domén a kalmodulin-szerű kalciumkötő doménnal kombinálódik (Ohno és mtsai, 1984).

A kalpainok számos fajban előfordulnak. Emlősök genomjában 16, a *Drosophila*-ban 4, a *C. elegans* -ban pedig 7 kalpain gén található. A 2001-es FASEB Konferencián a korábbi elnevezéseket kissé módosították és megállapodtak egy újabb nomenklatúrában [URL: <http://ag.arizona.edu/calpains/nomenclature.html>]. A humán kalpain szupercsalád tagjai csoportosíthatóak szövetben való lokalizációjuk alapján. Vannak általános előfordulású enzimek, ezek minden szövetben megtalálhatóak (pl.: μ - és a m-kalpain). Ugyanakkor vannak szövetspecifikus előfordulást mutató kalpainok is (pl.: az izomszövet- és szemlencse specifikus p94 és az emésztőtraktusra jellemző nCL-4). Szerkezetük alapján megkülönböztetünk tipikus és atipikus kalpainokat. A tipikus kalpainokban a nagy alegység négy doménből áll, míg az atipikus kalpainokban ezek a domének más szerkezetűek vagy éppen hiányoznak. Néhány kalpainról elmondható, hogy heterodimer szerkezettel rendelkeznek, amelyben a nagy és a kis alegység dimert képez, míg a legtöbb kalpain csupán a nagy alegységből áll.

Az emlős kalpainok legjobban jellemzett tagjai a μ - és a m-kalpainok (kalpain-1: EC 3.4.22.52 és a kalpain-2: EC 3.4.22.53). Nevüket az aktiválódásukhoz szükséges Ca^{2+} -koncentrációról kapták, ugyanis a μ -kalpain mikromólos, míg az m-kalpain millimólos [Ca^{2+}] mellett aktiválódik (Cong és mtsai, 1989). Heterodimer szerkezetűek, és jellemző rájuk, hogy egy nagy, 80 kDa méretű és egy kis, 30 kDa nagyságú alegységből állnak (6. ábra). Az aminosav szekvenciáik nagymértékben konzerválódtak (Suzuki, 1990), eddig

semmilyen bizonyíték nincs az alternatív splicing mechanizmusára a kalpain gének expressziója során.



6. ábra. *Drosophila* kalpainok és a patkány m-kalpain doménszerkezete

A sávok hossza arányos a polipeptid láncot alkotó aminosavak számával. A különböző domének a dI-dVI jelölést kapták. A Cys, His és Asn a dII-ben az aktív helyen lévő aminosavakat jelölik, ezek a kalpain C-ben hiányoznak (X). A függőleges vonalak a dIV-ben és dVI-ban az EF-kéz motívumokat jelzik. A kalpain A-ban a 76 aminosav hosszúságú beékelte peptid szakasz (INS) a dIII és a dIV között helyezkedik el (Friedrich és mtsai, 2004 alapján)

A nagy alegységet aminosav szekvencia alapján négy doménra (I-IV) osztották (Suzuki, 1990) (6. ábra). Az N-terminális I. domén nem mutat szekvencia azonosságot egyetlen polipeptiddel sem, továbbá a különböző fajokban is eltérő, mindössze 72-86 % a homológia mértéke ezen a területen. Funkciója pontosan nem ismert. A katalitikus II. doménban a cisztein proteázokra jellemző katalitikus triád kialakításában a Cys, His és Asn aminosavak vesznek részt. A cisztein a IIa, a hisztidin és az aszparagin a IIb részben található, ugyanis a katalitikus domént egy árok osztja két részre, aminek következtében Ca^{2+} távollétében az enzim inaktív formában van. Röntgenkristallográfiával kimutatták, hogy a IIa és IIb képesek egy-egy Ca^{2+} megkötésére és aktiválódásukkor a Ca^{2+} -indukált

konformáció változás következtében létrejön a katalitikusan funkcionális komplex (Moldoveanu és mtsai, 2002). A III. domén szerkezete hasonló a C2-doménre, amely számos jelátviteli (PKC) és membrán folyamatban (synaptotagmin) szerepet játszó fehérjében megtalálható (Rizo és Südhoff, 1998). Tulajdonképpen ez a fehérje Ca^{2+} -szabályozott foszfolipidkötő része, amely összeköti a molekula kalciumkötő és katalitikus doménjét (Tompá és mtsai, 2001). A IV. domén öt EF-kéz motívumot tartalmaz, amelyből az első négy a Ca^{2+} -kötésért, az ötödik a kis- és a nagy alegység dimerizációjáért felelős (Graham-Siegenthaler és mtsai, 1994).

A kis alegység szerkezete a két kalpainban azonos módon két részre osztható (6. ábra). Megkülönböztetjük az N-terminális V. domént (1-101 aminosav) és a C-terminális VI. domént (102-268 aminosav). Az V. domén eleje egy glicin gazdag régió, de emellett nagyszámú hidrofób aminosavat is tartalmaz. Gyakran hidrofób doménként azonosítják, amely a foszfolipid kötésben játszik szerepet (Imajoh, 1986). A VI. domént kalmodulin-szerű doménként tartják számon, ugyanis öt Ca^{2+} -kötő EF-kéz motívumot tartalmaz, ezáltal az öt-
EF-kéz család tagjaként azonosítják (Maki és mtsai, 1997). Azonban ezek közül csak négy játszik szerepet a Ca^{2+} -kötésben, az ötödik a dimerképzésben vesz részt (Xie és mtsai, 2001). A 268 aminosav hosszúságú kis alegység (CSS1) után felfedeztek egy rövidebb, 248 aminosav nagyságú kis alegységet (CSS2) is, amely az V. domén N-terminális részében különbözik és *in vitro* kísérletben úgy tűnt, hogy csak gyengén köti a nagy alegységet (Schád és mtsai, 2002).

A kalpain fő feladata, hogy szabályozó proteázként a szubsztrátfehérjéin csak limitált proteolízist hajt végre, ezáltal irreverzibilis módon közvetlenül módosítja más proteinek aktivitását és funkcióját (Friedrich és Bozóky, 2005). A kalpain rendszer fiziológiai funkciója még nem teljesen körülírt, ennek ellenére tudjuk, hogy fontos szerepet játszik számos sejtfolyamatban, mint például a citoszkeleton szerkezetének szabályozásában, a sejtciklusban, az apoptózisban és a sejtmozgásban (Goll és mtsai, 2003; Friedrich és mtsai, 2004).

Ezen emlősökben létfontosságú proteázok pontos szabályozása a mai napig nyitott kérdés, ugyanis az aktiválódásukhoz szükséges, fiziológiásnak nem mondható mikro- és millimoláris kalcium koncentráció azt sugallja, hogy egyéb tényezők is közrejátszanak a kalpainok szabályozásában. Irodalmi adatok alapján tudjuk, hogy a foszforiláció, mint poszttranszlációs esemény vagy szabályozó anyagok, mint például a foszfolipidek módosíthatják a kalpain aktivitását illetve Ca^{2+} -érzékenységét (Glading és mtsai, 2004; Shao

és mtsai, 2006). Ezek mellett ismert, hogy a kalpasztatin, mint gátló fehérje és az autolízis is befolyásolja az aktivitást (Suzuki és mtsai, 1981; Murachi, 1989).

Kezdetben azt találták, hogy a kalpain *in vivo* nem foszforilálódik (Adachi és mtsai, 1986), azonban a későbbiek folyamán sikerült kimutatni, hogy μ - és az m-kalpain is több aminosav oldalláncon (9 illetve 8) foszforilálódik (Cong és mtsai, 2000). A kalpainok átlagosan 2-4 foszfátot tartalmaznak molekulánként, amelyek eltávolítása katalitikusan szinte teljesen inaktív proteázt eredményez (Goll és mtsai, 2003). Az m-kalpainban két fő foszforilációs helyet azonosítottak (Ser50 és Ser369/370). A kísérletek azt mutatják, hogy a Ser50 oldallánc foszforilációja ERK kinázokkal növeli a kalpain aktivitását (Glading és mtsai, 2004). Ugyanakkor a PKA Ser369/370 foszforilációja gátolja a kalpain (Shihara és mtsai, 2002). Megfigyelték azt is, hogy nikotin indukált PKC ι foszforiláció mind a kalpain aktivitását, mind a szekrécióját növelte rákos tüdősejtekben (Xu és Deng, 2006).

Számos kísérletben kimutatták, hogy bizonyos foszfolipideknek szerepük van a kalpainok szabályozásában azáltal, hogy az autolízisükhöz szükséges Ca²⁺-koncentrációt lecsökkentik (Goll és mtsai, 2003). Ennek ellenére az még így is távol van a fiziológiás tartománytól. Feltételezések szerint a kalpain a plazmamembránban a Ca²⁺-csatornák környékén kölcsönhat a foszfolipidekkel, és ez a kölcsönhatás csökkenti le a szükséges Ca²⁺-koncentrációt. A pontos mechanizmus azonban a mai napig nem ismert.

A kalpasztatint régóta a kalpain természetes inhibitoraként tartják számon. Jellemző tulajdonsága, hogy hőstabil és denaturáló ágensekkel szemben széles körben ellenálló (Okitani és mtsai, 1976; Geesink és mtsai, 1998; Otsuka és Goll, 1987). További jellemzője, hogy rendezetlen szerkezetű (Tompa, 2002). A kalpasztatin az egyetlen olyan fehérje, amely specifikusan gátolja a kalpain. Az L és H-kininogen több más proteáz mellett a kalpain is gátolja. Ugyanakkor tudjuk, hogy a kalpasztatin a kalpainon kívül semmilyen más proteázt nem gátol (Crawford, 1990). Szerkezetére jellemző, hogy egyetlen polipeptid láncból épül fel, amely tartalmaz négy hasonló szerkezetű gátló domént és egy N-terminális L-domént, ez utóbbi hossza nagy változatosságot mutat az alternatív splicing következtében (Lee és mtsai, 1992a; Lee és mtsai, 1992b). Funkcióját tekintve az L-domén a kalcium csatornához való kötődésben játszik szerepet (Hao és mtsai, 2000) és nem rendelkezik gátló hatással (Takano és mtsai, 1988), míg a gátló domének külön-külön egy-egy kalpain megkötésére képesek egyszerre (Emori és mtsai, 1988). Minden egyes gátló domén magába foglal három aldomént (A, B és C), melyek közül az A és a C aldomén a kalpain IV. és VI. doménhez való kötődésért felelős (Takano és mtsai, 1995), a B aldomén pedig a kalpain gátlásáért felel

(Kawasaki és mtsai, 1993). Gerincesekben egy kalpasztatin gént mutattak ki, azonban a különböző promótereknek és az mRNS érésének köszönhetően számos izoformája létezik. Gerinctelenekben sem kalpasztatint, sem kalpasztatin-szerű aktivitást nem sikerült eddig kimutatni (Goll és mtsai, 2003).

1981-ben írták le, hogy kalcium jelenlétében a kalpain autolízissel aktiválódik és mindkét alegység N-terminális részéről lehasítódik egy-egy darab (Suzuki és mtsai, 1981). Erre azért van szükség, mert a kalpain a cisztein proteáz család tagjaként inaktív formában szintetizálódik. A folyamat következményeként csökken a félmaximális proteolitikus aktivitásához szükséges Ca^{2+} -koncentráció (Goll és mtsai, 1995). A 80 kDa méretű nagy alegység autolízise kétlépcsős mechanizmus révén megy végbe, amikor is a μ -kalpain-ról egy 26 aminosavból (Zimmerman és Schlaepfer, 1991), az m-kalpain-ról pedig egy 19 aminosavból álló peptidszakasz hasítódik le (Brown és Crowford, 1993). A 30 kDa méretű kis alegységből háromlépcsős folyamat eredményeképpen 91 aminosavból álló rész távolítódik el (McClelland és mtsai, 1989).

Számos patológiás folyamat ismert, amelyek a kalpainok genetikai rendellenességére vagy a megváltozott Ca^{2+} -homeosztázis következtében létrejövő kalpain aktivitás változásra vezethetőek vissza. A kalpainok részt vehetnek a gyomorrák, a 2-es típusú diabetes, az Alzheimer kór, a katarakta, az izomdisztrófia, a sclerosis multiplex és a stroke kialakulásában (Goll és mtsai, 2003).

3.3.2 *Drosophila* kalpainok

Drosophila-ban először 1988-ban írtak le kalpain-szerű aktivitást (Pintér és Friedrich, 1988). Később tisztították az egyetlen polipeptid láncból álló fehérjét, melyet kalpasztatinnal gátolni tudtak, illetve meghatározták, hogy a félmaximális aktivitásához szükséges kalcium koncentráció az emlős m-kalpainnal mutat azonosságot (Pintér és mtsai, 1992).

A *Drosophila* genomjában négy kalpain gén található (A, B, C és D). A géntermékek doménszerkezetét összevetve (6. ábra) látható, hogy a *Drosophila* kalpain A és B hasonlítanak az emlős kalpainok nagy, 80 kDa méretű alegységére, illetve kis alegységet nem tartalmaznak.

Jellemző rájuk, hogy egyetlen polipeptid láncból állnak és négy doménre oszthatók. Az N-terminálisan elhelyezkedő I. domént a katalitikus II. domén követi, az utóbbi aktív centrumában helyezkednek el a katalitikus triád kialakításában résztvevő aminosavak (Cys, His és Asn). A III. domén a fehérje Ca^{2+} -szabályozott foszfolipidkötő része, míg a IV. domén öt EF-kéz motívumával a Ca^{2+} megkötésében vesz részt. Ezen felül kisebb-nagyobb eltérések találhatóak a kalpain A és B szerkezetében (6. ábra), ennek ellenére mindketten a tipikus kalpainok közé sorolhatóak.

A 94 kDa méretű kalpain A jellegzetessége még, hogy tartalmaz egy 76 aminosavból álló beékelte peptid szakaszt a III. és a IV. domén között. Ennek közepén található egy 16 aminosavból álló hidrofób rész (GAGACGLLSLICGPFL), amelynek a membránhoz való kihorgonyzásban tulajdonítanak szerepet. Az I. domén N-terminális régiója ugyanakkor nem mutat homológiát egyetlen más fehérjével sem (Jékely és Friedrich, 1999). A kalpain A génről alternatív splicing révén kétféle izoforma jön létre. Kimutatták, hogy míg az 1. izoforma tartalmazza, a 2. izoformában nem található meg a IV. domén. Az élőlény egyedfejlődése során minden egyes fejlődési stádiumban megjelenik a kétféle transzkript, felnőttben azonos gyakorisággal, míg az embrióban az első forma többszöröse a másikkal. Annak ellenére, hogy a kalpain A mRNS-e számos sejttípusban megtalálható, a fehérje szövetspecifikus megjelenést mutat, a központi idegrendszer és a középbél bizonyos sejteiben és a vérsejtekben koncentrálódik (Theopold és mtsai, 1995).

A kalpain B egy 104 kDa nagyságú fehérje. Jellemző rá, hogy egy nagyon hosszú, 224 aminosavból álló N-terminális domént hordoz, amely 22%-ban prolint és kilenc ismétlődő PYP motívumot tartalmaz. Eredetileg rendezetlen szerkezettel rendelkezik (Tompa, 2002), de rendezetté válik a célfehérjével való kötődéskor. A kalpain B-nek csak egyetlen átírata van. A mRNS és a fehérje szintek közel párhuzamosan változnak az egyedfejlődés során. A fehérje expresszió embrióban magas, a korai lárvális stádiumban a legkisebb, a 3. lárvális stádiumtól újra emelkedik, a bábban és az imágóban pedig állandó szintet mutat. Különösen nagy mennyiségben van a lárva nyálmirigyében (Farkas és mtsai, 2004a).

A kalpain C szerkezetileg hasonló a másik két kalpainhoz, tehát tipikus forma, ugyanakkor nem rendelkezik katalitikus aktivitással, ugyanis az aktív helyen lévő aminosavak mutációt szenvedtek (Cys \rightarrow Arg, His \rightarrow Val, és Asn \rightarrow Ser). Lényegében egy csonkolt kalpain forma, ugyanis hiányzik a teljes I. domén és egy kb. 20 aminosav hosszúságú rész a II. doménből. A kalpain C II. és III. doménjét összehasonlítva a kalpain B

megfelelő doménjaival 30 és 35 %-os azonosságot találtak. A kalpain C mRNS mindenütt kimutatható a fejlődés során, extrém magas szinten található a bábban. A fehérje láthatóan nagy mennyiségben a nyálmirigyben jelenik meg (Spadoni és mtsai, 2003).

A *Drosophila* kalpain család első tagjaként a kalpain D gént fedezték fel, amelyet eredetileg SOL-nak (small optic lobe) neveztek. Kimutatták, hogy a gén mutációja következtében a muslica látólebenye csökevényesen fejlődik és az idegi defektus hatására az élőlény repülése illetve járása megváltozott (Delaney és mtsai, 1991). A gén homológja megtalálható az emlősökben is (SOLH), terméke, a Solh protein a szaglógumóban található és az érző neuronok fejlődésében játszik szerepet (Kamei és mtsai, 2000). Szerkezete nagymértékben eltér a többi kalpain formától. A polipeptidlánc három doménból áll, amely egy hosszú, cink-ujj-szerű ismétlődésekből álló domént, a kalpain-szerű proteáz domént és egy ismeretlen funkciójú C-terminális domént (SOL) tartalmaz. Mindezek következtében a kalpain család atipikus tagjaként tartják számon, bár az aktív centrumban tartalmazza a kalpainokra jellemző három kitüntetett aminosavat.

3.3.3 Kalpain B

A kalpain B Ca^{2+} -függő proteáz, a félmaximális aktiválódásához szükséges Ca^{2+} -koncentráció a millimoláris tartományba esik. Aktiválódása során az N-terminális része Ca^{2+} -függő módon lehasad az autoproteolitikus reakció során. A szubsztrát hasítás kinetikai görbéjét tanulmányozva megfigyelhető, hogy a vad típusú kalpain B esetében a görbe egy aktivációs fázissal indul, mielőtt az enzim elérné a teljes aktivitást. Annál a kalpain B mutánsnál, amelyből hiányzott a fehérje N-terminális doménjének az autolízis során lehasadó része, nem volt megfigyelhető ez az aktivációs fázis, ami azt mutatja, hogy az autolízisnek szerepe van az aktiválásban (Jékely és Friedrich, 1999). Az autolízis két lépcsőben zajlik, aminek eredményeként a 104 kDa méretű kalpain B 81 kDa nagyságúvá degradálódik (Farkas és mtsai, 2004a). Irányított mutagenézissel olyan mutáns kalpain formákat hoztak létre, amelyekben az autolízis helyeket megváltoztatták annak érdekében, hogy felderítsék, milyen összefüggés van az autolízis és aktiválás között. Korábban az m-kalpain esetében azt kapták, hogy a mutáció kivédte az autoproteolízist, a fehérje nem autolizált, ennek ellenére mégis teljes aktivitással rendelkezett (Elce és mtsai, 1997). Ezzel szemben a kalpain B mutánsok esetében az autolízis lejátszódott, még hozzá az eredeti hasító helyektől nem

messze, majd csak ezt követően aktiválódott az enzim. Tehát a kalpain B esetében az autolízis előfeltétele lehet a kalpain B aktiválódásának, mivel a teljes hosszúságú N-terminális rész minden valószínűség szerint gátló hatással rendelkezik (Farkas és mtsai, 2004a). Ugyanakkor a Ca^{2+} -függő konformáció változásról megállapították, hogy a katalitikus hely kialakításában fontos szerepe van. Az elmélet szerint Ca^{2+} -kötődés hatására olyan konformációváltozás sorozat indul meg a IV. kalmodulin-szerű domén felől a III. domén savas régiója irányába, amely végül a IIa és IIb záródásához és a fehérje aktiválódásához vezet (Alexa és mtsai, 2004).

A kalpainok aktiválódásához tehát elengedhetetlenül fontos a citoplazma Ca^{2+} -koncentrációjának növekedése. Azonban *in vitro* körülmények között a kalpain B félmáximális aktiválódásához szükséges 2-4 mM Ca^{2+} -koncentráció igencsak messze van a fiziológias tartománytól (Jékely és Friedrich, 1999). Minden bizonnyal egyéb tényezők is közrejátszanak az aktiválódáshoz szükséges kalcium igény lecsökkentésében. A foszfolipidek (pl.: PIP2, PIP, PI) mind az aktiválódás sebességét, mind a maximális aktivitást megnövelték a kalpain A esetében, azonban a kalpain B-nél mérsékelt hatást eredményeztek. Ugyanakkor a fehérje kalcium érzékenységét csak kis mértékben csökkentették (Jékely és Friedrich, 1999). Az emlős kalpain aktivátor fehérje homológját megtalálták *Drosophila*-ban is, de annak semmilyen hatása nem volt a fehérje aktiválódására (Farkas és mtsai, 2004b). Ezzel szemben az emlős kalpain inhibitorával, a kalpasztatinnal homológ fehérjét eddig nem sikerült kimutatni *Drosophila*-ban, bár korábban muslica kivonatban detektáltak egy kalpain gátló hatást (Pintér és Friedrich, 1988). A *Drosophila* kalpainok foszforilálhatóságát még nem mutatták ki. Tekintettel arra, hogy az emlős m-kalpain foszforilációját már igazolták és bizonyították, hogy ez a poszt-szintetikus módosítás befolyásolja az enzim aktivitását (Glading és mtsai, 2004; Shihara és mtsai, 2002), lehetséges, hogy a *Drosophila* kalpainok is szabályozhatóak foszforilációval.

4. CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk során két kérdésre kerestünk választ és az alábbi célkitűzéseket fogalmaztuk meg:

A *Drosophila* kalpain B foszforilációjának vizsgálata

Kérdés: Foszforilálható-e a *Drosophila* kalpain B és ha igen, ennek milyen hatása van az aktivitására?

Célkitűzések:

1. Rekombináns kalpain B foszforilálása *in vitro* körülmények között PKA, ERK1 és ERK2 enzimekkel
2. A foszforiláció sztöchiometriájának meghatározása
3. A foszforilációs hely(ek) azonosítása tömegspektrometriai módszerekkel
4. Az *in vitro* foszforiláció hatása az enzim működésére
5. Az *in vivo* foszforiláció igazolása

A *Candida albicans* protein foszfatáz Z1 gén polimorfizmusának vizsgálata

Kérdés: Milyen a *C. albicans* PPZI génjének szerkezete? Kimutatható-e a gén polimorfizmusa, és ha igen, felhasználható-e diagnosztikai célokra?

Célkitűzések:

1. A *C. albicans* PPZI gén azonosítása
2. Különböző *C. albicans* törzsekből származó PPZI gének szekvenciájának meghatározása
3. A genetikai polimorfizmus elemzése, szerkezeti vonatkozásainak felderítése
4. A polimorfizmus felhasználása klinikai *C. albicans* minták jellemzésére

5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

5.1 Anyagok

5.1.1 Vegyszerek

A kísérletekben felhasznált vegyszerek többségét a *Sigma-Aldrich* cégtől szereztük be. A továbbiakban megadom az ettől eltérő beszerzési forrásokat. *Amersham Biosciences*: Rediprime II. DNS jelölő készlet, Hybond N+ membrán, Sephadex G-25, Hybond ECL nitrocellulóz membrán. *Becton Dickinson*: CHROMagar Candida teszt. *Biomérieux*: API ID32C panel. *Bio-Rad*: agaróz és alacsony olvadáspontú agaróz. *Calbiochem*: PKA, ERK 1 és ERK2. *Fermentas*: Long PCR polimeráz, Pfu polimeráz, Taq polimeráz, dNTP készlet, 100 bp DNS létra, restriktív enzimek; *AccI*, *AluI*, *DdeI*, előfestett fehérje standard. *Gibco*: FBS, penicillin, streptomycin. *Invitrogen*: 1 kbp DNS létra. *Izotóp Intézet Kft.*: [$\alpha^{32}\text{P}$] dCTP, [$\gamma^{32}\text{P}$] ATP. *Merlin Diagnostika GmbH*: Micronaut-Candida rendszer. *Merck*: β -merkaptotanol, proteináz K. *Millipore*: Microcon YM-100 oszlop. *Pierce*: Supersignal West Pico kemilumineszcens szubsztrát. *Promega*: „Wizard SV gel and PCR clean-up system” készlet, T4 DNS ligáz, restriktív enzimek; *EcoRI*, *HindIII*, *SaII*, *BglI*. *Roche*: EDTA-mentes proteáz inhibitor koktél tabletta. *Qiagen*: QIAquick gélextrakciós készlet, QIAprep Spin Miniprep plazmid izoláló készlet. *Upstate*: PKA. *Whatman*: DEAE52-cellulóz gyanta, P81 papír.

5.1.2 Tápoldatok, táptalajok

LB (Luria-Bertani-féle) agar: 10 g/l tripton, 5 g/l élesztő kivonat, 10 g/l NaCl, 1,5 % agar, pH 7,0

LB tápoldat: 10 g/l tripton, 5 g/l élesztő kivonat, 10 g/l NaCl, pH 7,0

SOC: 20 g/l tripton, 2 g/l élesztő kivonat, 0,6 g NaCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glükóz, pH 7,0

2xYT: 16 g/l tripton, 10 g/l élesztő kivonat, 5 g/l NaCl, pH 7,0

Sabouraud agar: 5 g/l kazeinpepton, 5 g/l húspepton, 40 g/l D-glükóz, 0,5 g/l klóramfenikol, 20 g/l agar, pH 5,6

5.1.3 Pufferek, oldatok

10x PBS (pH 7,4): 35,6 g/l dinátrium-hidrogén-foszfát, 61,5 g/l NaCl

10x PBST (pH 7,4): PBS + 0,1 % Tween 20

1x TE puffer: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0

50x Denhardt oldat: 1% Ficoll, 1% borjú szérum albumin, 1% polivinil-pirrolidon

20x SSC: 3 M NaCl, 0,3 M Na-citrát, pH 7,0

5x SDS-mintapuffer: 50% glicerin, 10% SDS, 310 mM Tris, 100 mM DTT, 0,01 % brómfenolkék

Transzfer puffer: 120 mM Tris-HCl, 40 mM glicin, 20 v/v% metanol

5.1.4 Vektorok

A *S. cerevisiae* PPZ1 cDNS-t tartalmazó pSP72 vektort Prof. Joaquin Ariño (Barcelonai Autonóm Egyetem, Barcelona, Spanyolország) biztosította számunkra.

A pGEM-T Easy vektort a Promega cégtől vásároltuk.

5.1.5 Rekombináns fehérjék

A rekombináns vad típusú, inaktív és mutáns kalpain B fehérjék, illetve a MAP2c expresszióját és tisztítását Dr. Alexa Anita (MTA, SZBK, Enzimológiai Intézet, Budapest) végezte a korábban leírtak szerint (Alexa és mtsai, 2004).

5.1.6 Poliklonális kalpain B antitest

A kalpain B ellen nyúlban termeltetett szérumot Prof. Erdei Annától (ELTE, Budapest) kaptuk.

5.1.7 Oligonukleotid primerek

A vektorspecifikus SP6 promóter primert (5'-TATTTAGGTGACACTATAG - 3') és a T7 promóter primert (5'-TAATACGACTCACTATAGGG - 3') a DNS szekvenáló laborok (MTA SZBK és BIOMI Kft) biztosították.

A *CaPPZ1* gén vizsgálatára a PCR reakciókhoz és a DNS szekvenáláshoz felhasznált *CaPPZ1* gén-specifikus oligonukleotid primereket az Integrated DNA Technologies Incorporation-tól szereztük be (1. táblázat).

1. táblázat. *CaPPZ1* gén-specifikus oligonukleotidok összefoglalása

Elnevezés*	DNS szekvencia	Célszekvencia**
CaPPZ1U	5'- CGT TGT GTA ATG GCT AGG AG - 3'	(-499) - (-480)
CaPPZ1L	5'- GTA CTT GAT GCT ATG GTA TCG G - 3'	2184 - 2163
CaPPZ2U	5'- AAC TTG TTG TCT TTT CTT CTT CCC - 3'	(-120) - (-97)
CaPPZ2L	5'- ATA TTT TTG GTC CGT GTG C - 3'	1792 - 1774
CaPPZ3U	5'- CAG CAA CTT CAG AAA ATC C - 3'	219 - 237
CaPPZ3L	5'- TAA AGC AGC ACT ATC TAA AGG - 3'	1396 - 1376
CaPPZ4U	5'- ATG TGC CAA TGT CAC TCG - 3'	862 - 879
CaPPZ4L	5'- GAG TGA CAT TGG CAC ATT C - 3'	878 - 860
CaPPZ5U	5'- ATC CTT TAG ATA GTG CTG C - 3'	1374 - 1392
CaPPZ5L	5'- GAT GAC TTG TGA GAT GTT G - 3'	429 - 411
CaPPZ6L	5'- GGA CCT TCT CAG TCT TAT TG - 3'	100 - 81

* U-val jelöltük az upper (forward), L-lel a lower (reverz) oligonukleotidokat.

** A célszekvenciát a *CaPPZ1* gént kódoló szál szekvenciája alapján adtuk meg, ahol az első nukleotid a start kodon (ATG) A-ja.

5.1.8 Biológiai minták

A *Candida albicans* 10231 és 14053 referencia törzseket az ATCC-től szereztük be. A klinikai izolátumokból származó *Candida albicans* törzsek a DEOEC Orvosi Mikrobiológiai Intézetéből származtak. Két eset kivételével ugyanazon betegből két minta állt rendelkezésünkre, az egyiket vérből izolálták, a másik minta a fertőzés helyéről származott (2. táblázat).

2. táblázat. A *Candida albicans* klinikai izolátumok eredete

Kódszám	Beteg neme	Beteg kora	Diagnózis	Minta eredete
19890	Nő	59 év	trombotikus thrombocitopéniás purpura	szövetváladék
19888				vér
20072	Férfi	34 év	hasnyálmirigy-gyulladás	hasüreg
19627				vér
10934	Nő	45 év	vastagbélrák	tracheotómiai kanül
10920				vér
10668	Férfi	82 év	vastagbélrák	szövetváladék
10477				vér
8387	Nő	10 év	Langerhans sejtes hisztocitózis	szájüreg
16053				vér
4774	Nő	42 év	szívelégtelenség	vizelet
4780				vér
17433	Férfi	35 év	angina pectoris	tracheotómiai kanül
17471				vér
9054	Nő	5 év	mellhártyagyulladás	vér
7111	Nő	70 év	leukémia	vér

Az *Escherichia coli* DH5 α törzset a Novagen-től szereztük be.

A *Drosophila* Schneider S2 sejtvonalat az Invitrogen cégtől vásároltuk.

5.2 Módszerek

5.2.1 Tenyésztési eljárások

5.2.1.1 *Candida albicans* törzsek tenyésztése

A *C. albicans* törzsek tenyésztése folyékony Sabouraud tápoldatban történt Fekete és mtsai (2008) szerint. Egy kacsnyi gombát egy éjszakán át növesztettünk 5 ml folyékony Sabouraud tápoldatban. Ebből indítottunk 100 ml-es tenyészetet és inkubáltuk 15-16 órán át, 28 °C-on 140 rpm-mel. A kiindulási OD₆₄₀ = 0,1 volt. A gombaszuszpenziót 1x PBS-sel mostuk, majd centrifugáltuk. Az így kapott gombatenyészetet folyékony N₂-ben lefagyasztottuk és -70 °C-on tároltuk.

5.2.1.2 Egyetlen sejtből létrehozott tiszta klónok tenyésztése

Az ATCC 10231 tesztörzs folyékony, hígított tenyészetéből a DE OEC Biofizikai és Sejtbiológiai Intézetében rendelkezésünkre bocsájtott mikromanipulátor segítségével különálló gombasejteket izoláltunk, amelyeket folyékony Sabouraud tápfolyadékba juttattunk, majd a korábbiakban leírtak szerint tenyésztettünk. Ezáltal különálló *C. albicans* sejteket izoláltunk és egyetlen sejtből szubkultúrákat növesztettünk fel.

5.2.1.3 *Candida albicans* törzsek azonosítása

A *C. albicans* törzsek azonosítását CHROMagar Candida teszt (Becton Dickinson), API ID32C panel (Biomérieux) és Micronaut-Candida rendszer (Merlin Diagnostika GmbH) felhasználásával végeztük (Fekete és mtsai, 2008; Szabó és mtsai, 2008).

5.2.1.4 A *Drosophila* S2 sejt vonal fenntartása

A kísérleteink során használt *Drosophila* Schneider S2 sejteket (Invitrogen) 20 mM L-glutaminnal kiegészített rovar tápoldatban (Sigma) tenyésztettük 23 °C-on, amely 10 % FBS-t (Gibco), 50 unit/ml penicillin-t (Gibco) és 50 µg/ml streptomycin-t (Gibco) tartalmazott.

5.2.2 Nukleinsav vizsgáló módszerek

5.2.2.1 Genomi DNS izolálása

A genomi DNS-t tömény gombaszuszpenzióból Lee és mtsai (1988) leírása alapján izoláltuk. A DNS minták abszorbanciáját 260 nm-en ill. 280 nm-en vizsgáltuk 1x TE-pufferrel szemben. A DNS koncentrációt a 260 nm-en mért fényelnyelés alapján, a DNS tisztaságát az OD_{260} / OD_{280} arány alapján határoztuk meg, illetve 1 % agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük.

5.2.2.2 Agaróz és poliakrilamid gélelektroforézis

A nagyobb DNS fragmenteket 1 %-os agaróz gélben (Bio-Rad) választottuk el. Az agaróz gélelektroforézis során alkalmazott 1 kbp DNS létrát az Invitrogen cégtől vásároltuk. Az RFLP analízis után a kisebb DNS fragmentek méretét 5%-os poliakrilamid (Sigma) gélelektroforézissel (Sealey és Southern, 1990) ellenőriztük 100 bp DNS standard (Fermentas) alkalmazásával.

5.2.2.3 Southern blot

A kívánt mennyiségű (1-2 μ g) genomi DNS-t olyan restrikciós endonukleáz enzimmel (*Hind*III) (Promega) emésztettük, amelynek nincs hasítási helye a gén kódoló régióján belül. A restrikciós emésztést az enzim leírása szerint 37 °C-on, két órán át végeztük.

A próba előállításához Prof. Joaquin Ariño (Barcelonai Autonom Egyetem) munkacsoportjától *Saccharomyces cerevisiae* *PPZ1* cDNS-t tartalmazó plazmidot kértünk. Ha a *PPZ1* cDNS próba pSP72 vektorból való kivágásához csak a *Hind*III és *Sal*I enzimeket (Promega) használtunk volna, akkor a próba és vektor mérete közel azonos lett volna. Ezért szükséges volt az emésztést a *Bgl*I enzimmel (Promega) is elvégezni, ami a vektort kettéhasította, így lehetővé vált a keletkező DNS fragmentek agaróz gélelektroforézissel való hatékony elválasztása. A megfelelő méretű 2257 bp nagyságú sávot kivágtuk és a DNS tartalmat gél extrakciós készlet (Qiagen) segítségével nyertük ki. A DNS próbát random primer jelölési módszerrel, Rediprime II. kit (Amersham Biosciences) alkalmazásával

készítettük a cég leírása szerint [$\alpha^{32}\text{P}$] dCTP izotóp (Izotóp Intézet Kft) felhasználásával. A be nem épült nukleotidokat a reakcióelegy Sephadex G-25 oszlopon végzett kromatográfiájával távolítottuk el. A beépülés hatásfoka 86,2 % volt.

A restriktációs enzimmel emésztett DNS mintát 1 %-os agaróz gélen (Bio-Rad) választottuk el, majd vákuum készülék (BioRad Model 785 Vacuum Blotter) segítségével gélből Hybond N+ membránra (Amersham Biosciences) blottoltuk át. A DNS membránhoz való kötése céljából a membránt 80 °C-on, 30 percig hőkezeltük, majd két ciklusban 245 nm hullámhosszú UV-fénnyel (1200 kJ/cm² energiasűrűséggel) megvilágítva keresztkötéseket alakítottunk ki. A prehibridizációt 50 °C-on 3 órán át Mini Dual 14 (HYBAID) készülékben végeztük az alábbi pufferben: 5x SSC, 5x Denhardt oldat, 0,1 % SDS, 100 µg/ml hődenaturált heringsperma DNS. A hibridizáció céljából a prehibridizációs oldathoz hődenaturált ³²P-jelzésű DNS próbát adtunk 10⁶ cpm/ml koncentrációban. A hibridizáció 50 °C-on, a hibridizációs cső állandó forgatása közben 16 órán át történt. A hibridizáció után az alábbi mosásokat alkalmaztuk: 2 x 15 perc szobahőmérsékleten, 2x SSC; 0,1% SDS oldattal, majd 30 perc 40 °C-on, 0,5x SSC; 0,1% SDS oldattal.

A detektálás 2 napos autoradiográfiával történt Fuji RX röntgenfilm felhasználásával. A film előhívása után a membrán mosását magasabb hőmérsékleten, kisebb ionerősségű oldatban is elvégeztük (60 °C, 0,1x SSC, 0,1% SDS) és megismételtük az autoradiográfiát.

5.2.2.4 Polimeráz láncreakció és klónozás

Az NCBI adatbázisában [URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore>] található *C. albicans* protein foszfatáz Z gén nukleotid szekvenciája alapján oligonukleotid primereket terveztünk, amelyek közül az egyik pár (CaPPZ1U és CaPPZ1L) a gén kódoló régióját és jelentős nem kódoló szakaszait fogja közre, a másik pár (CaPPZ5U és CaPPZ2L) a gén 3'-végén található hipervariábilis régióját határolja (lásd 1. táblázat). A polimeráz láncreakciót követően a termékeket először pGEM-T Easy vektorba ligáltuk, majd DH5α *E. coli* sejtekbe transzformáltuk. Az PCR reakciókat Eppendorf Mastercycler PCR készülékben végeztük.

A kb. 2700 nukleotid nagyságú genomi DNS szakaszt Long PCR polimeráz enzimkeverékkel, CaPPZ1U és CaPPZ1L oligonukleotid primerpár felhasználásával szaporítottuk fel a következő reakcióközegben:

PCR puffer +MgCl ₂ (10x cc → 1x cc)*	2,5 µl
dNTP (10 mM → 0,2 mM)*	0,5 µl
Primer 1-2 (5µM → 0,2 µM)*	1-1 µl
Long PCR polimeráz 5 U/µl	0,2 µl
genomi DNS (4-500 ng)	1 µl
steril H ₂ O	18,8 µl
végtérfogat	25 µl

* → mutatja a végkoncentrációt

A hőmérsékleti profilt az alábbiak szerint állítottuk össze:

Lépés	hőmérséklet	idő
1.	94 °C	2 perc
2.	57 °C	1 perc
3.	72 °C	3 perc
4.	94 °C	0,5 perc
	2-4. ismétlése 30 ciklusban	
5.	72 °C	10 perc

A *PPZI* gén hipervariábilis régióját Pfu polimerázzal, CaPPZ5U és CaPPZ2L primerpár felhasználásával amplifikáltuk a következőkben leírt reakcióközeg alkalmazásával:

PCR puffer -MgSO ₄ (10x cc → 1x cc)*	2,5 µl
dNTP (10 mM → 0,2 mM)*	0,5 µl
Primer 1-2 (5µM → 0,2 µM)*	1-1 µl
MgSO ₄ (25 mM → 2 mM)*	2 µl
Pfu polimeráz. 2,5 U/µl	0,5 µl
genomi DNS (4-500 ng)	1 µl
steril H ₂ O	16,5 µl
végtérfogat	25 µl

* → mutatja a végkoncentrációt

A hőmérsékleti profil a következő volt:

Lépés	hőmérséklet	idő
1.	95 °C	2,5 perc
2.	54 °C	1 perc
3.	72 °C	1 perc
4.	95 °C	0,5 perc
	2-4. ismétlése 30 ciklusban	
5.	72 °C	10 perc

Az PCR termékek méretét agaróz gélelektroforézissel vizsgáltuk 1 % gélen.

A PCR termékeket közvetlen szekvenáláshoz Microcon YM-100 oszlop (Millipore) segítségével tisztítottuk, A-tailing reakcióhoz, illetve klónozáshoz agaróz gélelektroforézissel szeparáltuk, majd Wizard SV gel and PCR clean-up system kit (Promega) segítségével gélből izoláltuk a cég leírása szerint.

A Pfu polimerázzal előállított tompa véggel rendelkező PCR termékek esetében a tisztítást követően szükséges volt egy túlnyúló A-vég kialakítása a pGEM-T Easy vektorba történő sikeres ligáláshoz. A reakciót Taq polimerázzal (Fermentas) végeztük 70 °C-on 30 percig az alábbiak szerint:

Tisztított, Pfu-val előállított tompa végű PCR termék (10-15 ng)	x µl
10 x Taq puffer +(NH ₄)SO ₄ ; -MgCl ₂ (10x cc → 1x cc)*	1 µl
MgCl ₂ (25 mM → 1,5 mM)*	0,6 µl
dATP (2mM → 0,2 mM)*	1 µl
Taq DNS polimeráz 5U/µl	1 µl
steril H ₂ O	6,4-x µl
végtérfogat	10 µl

* → mutatja a végkoncentrációt

A PCR termékeket T4 DNS ligázzal (Promega) pGEM-T Easy vektorba (Promega) ligáltuk. A ligálási közeget az alábbi táblázat szerint állítottuk össze:

Ligáz puffer (10x cc --- 1x cc)*	5 µl
pGEM-T Easy vektor (50 ng/µl)	1 µl
PCR termék	1 µl
T4 DNS ligáz (3U/µl)	1 µl
steril H ₂ O	2 µl
végtérfogat	10 µl

* → mutatja a végkoncentrációt

A ligálási elegyet 4 °C -on inkubáltuk egy éjszakán át.

Kompetens *E. coli* DH5α sejtek készítése során az Inoue és mtsai (1990) által kidolgozott módszert vettük alapul. Kompetens sejtek preparálásához *E. coli* DH5α LB táptalajra szélesztett kolóniáiból indultunk ki. Egyetlen teleppel inokulumot indítottunk 60 ml 2xYT táptalajban egy éjszakán át 37 °C-on, 200 rpm-mel való rázatással. Ebből a tenyészetből 100x hígítást készítettünk, majd az előbbi körülmények között növesztettük OD 0,3-0,5 érték eléréséig. Ezután a tenyészetet 5 perc jégen állást követően centrifugáltuk (5000 rpm, 5 perc, 4 °C-on); a tápoldatot maradéktalanul leöntöttük, és a sejteket szuszpendáltuk 30 ml jéghideg 50 mM CaCl₂ oldatban (pH 7,4), majd 30 percig jégben való inkubálás után a fentiek szerint centrifugáltuk. A felülúszót eltávolítottuk, és a sejteket újrászuszpendáltuk 3 ml jéghideg 50 mM CaCl₂ oldatban, majd a sejszuszpenzió 340 µl térfogatú részleteit Eppendorf csövekbe adagoltuk és 60 µl steril glicerin hozzáadása után a sejtek transzformálásáig -70 °C-on tároltuk.

A transzformálás során 50 µl kompetens sejthez 5 µl ligálási elegyet adtunk, és jégen inkubáltuk 40 percig. 42 °C-on 50 másodpercig alkalmazott hősokkolás, majd két perc jégen állás után a sejtekhez 200 µl SOC táptalajt adtunk, majd egy órán át rázattuk 37 °C-on, 150-200 rpm sebességgel. A baktériumsejteket ezután 100 µg/ml ampicillint, 0,5 mM IPTG-t és 80 µg/ml X-gal-t tartalmazó LB-agar táptalajra szélesztettük és egy éjszakán át 37 °C-on inkubáltuk.

A plazmid izolálás első lépéseként a beépült DNS szakaszt tartalmazó plazmidot

hordozó fehér *E. coli* telepeket 100 µg/ml ampicillint tartalmazó 5 ml LB folyékony táptalajba oltottuk le és inkubáltuk egy éjszakán át 37 °C-on, 200 rpm fordulatszámú rázatás mellett. A plazmidot QIAprep Spin Miniprep plazmid izoláló kit (Qiagen) segítségével izoláltuk a cég leírása szerint. A beépült DNS méretét a plazmid *EcoRI* (Promega) restrikciós enzimmel történő emésztését követően agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük 1 %-os gélen.

5.2.2.5 DNS szekvenálás

A klónok ellenőrzésére a beépült DNS-t szekvenáltattuk az MTA SZBK Szegedi Biológiai Kutató Központ DNS Szekvenáló Laboratóriumában illetve Gödöllőn a BIOMI Kft-nél vektorspecifikus T7 és SP6 primerek, illetve az 1. táblázatban található foszfatáz specifikus primerek felhasználásával.

5.2.2.6 RFLP analízis

Az RFLP analízis során a *CaPPZ1* gén hipervariábilis régiójának felszaporításakor keletkezett PCR termékeket közvetlenül emésztettük *AccI*, *AluI*, és *DdeI* (Fermentas) enzimek kombinációjával a cég leírása alapján Tango™ pufferben egy éjszakán át 37 °C-on. A fragmentek méretét 5 % SDS-PAGE-sel (Sealey és Southern, 1990) ellenőriztük.

5.2.3 Fehérjevizsgáló módszerek

5.2.3.1 SDS poliakrilamid gélelektroforézis

A fehérjék méretét és tisztaságát SDS-PAGE-sel (Laemmli, 1970) ellenőriztük 10 %-os gélen előfestett fehérje standard (Fermentas) segítségével.

5.2.3.2 *In vitro* és *in vivo* fehérje foszforiláció

A kalpain B *in vitro* foszforilációja során 80 µg rekombináns vad típusú és mutáns kalpain B fehérjét foszforiláltunk 200 µl-es reakcióközegben (50 mM Tris-HCl, pH= 7,5; 1mM benzamidin, 1 mM PMSF, 1 mM EGTA, 2 mM DTT, 10 mM NaF, 0,05 mM Na-vanadát, 25 mM MgCl₂, 0,5 mM ATP). A radioaktív és nem radioaktív foszforilálási

reakciókat azonos körülmények között egymással párhuzamosan végeztük. A reakciókat protein kináz hozzáadásával indítottuk - (0,08 μg (90U) PKA (Upstate, Calbiochem); 0,6 μg (3,6U) ERK1 (Calbiochem) vagy 0,6 μg (3,3U) ERK2 (Calbiochem) - és 50 mM EDTA-val állítottuk le.

Radioaktív foszforiláció esetében 10^7 cpm [$\gamma^{32}\text{P}$] ATP-t (Izotóp Intézet Kft) is tartalmazott a reakcióközeg. A reakcióelegyet 30 °C-on inkubáltuk két órán át, közben meghatározott időközönként (0, 30, 60 és 120 perc) 5-5 μl mintát vettünk és 2x SDS-mintapufferhez adtuk, illetve kationcserélő papírra (Whatman P81) cseppentettük. Utóbbit 3x 10 percig mostuk 0,5 % H_3PO_4 , 10 % TCA oldatban, majd 5 ml 0,25 N NaOH oldatot tartalmazó folyadékszintillációs csőbe helyeztük és megmértük a minták Cserenkov sugárzást. Ezt követően kiszámoltuk, hogy hány mól foszfát épült be 1 mól rekombináns fehérjébe az adott időpontokig (Witt és Roskoski, 1975). A minták másik részletét SDS-PAGE-sel választottuk el 10 %-os gélen (Laemmli, 1970), majd a Coomassie Brilliant Blue R250 festést követően a gél beszárítottuk. A ^{32}P beépülést autoradiográfiával detektáltuk Fuji RX röntgenfilm felhasználásával.

A nem radioaktív foszforilálási reakciók esetében a két órás inkubáció után a mintákat SDS-PAGE-sel választottuk el 10 %-os gélen (Laemmli, 1970), majd a gél festését követően a megfelelő méretű sávokat kivágtuk és tömegspektrometriai analízisre küldtük.

A kalpain B *in vivo* foszforilációját megelőzően az S2 sejteket 100 %-os konfluenciáig növesztettük. PBS-sel történő mosást követően a PKA útvonal stimulálása érdekében a sejteket 20 μM forskolin-nal (Sigma) és 100 nM calyculin-A-val (Sigma) 15 percig inkubáltuk; az ERK útvonal aktiválásához a sejteket először 10 nM EGF (Sigma) jelenlétében egy órán át, majd 100 nM calyculin-A-val 10 percig inkubáltuk 23 °C-on. A kezelések végén a kezelt és a kezeletlen sejteket centrifugálással (3600 rpm, 5 perc, 4 °C) gyűjtöttük össze, jéghideg PBS-sel mostuk, lízis pufferben (20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM NaF, 1 mM Na-vanadát, 1 % Triton X-100, 0,01% mM β -merkapto-etanol és EDTA-mentes proteáz inhibitor mix) szuszpendáltuk, majd 4x 15 másodpercig jégen ultrahanggal kezeltük (Branson 250 Sonifier). Az ultrahangos kezelést követően a lizátumot centrifugáltuk (14000 rpm, 10 perc, 4 °C). Az így kapott felülúszót immunprecipitációs kísérletekhez használtuk fel.

5.2.3.3 Tömegspektrometria

A vad típusú és a mutáns kalpain B fehérjék foszforilációja alkalmával illetve az immunprecipitációs kísérletek során kapott mintákat 10 % SDS-PAGE-sel választottuk el (Laemmli, 1970), majd Coomassie Brilliant Blue R250 festést követően a 104 kDa méretű sávokat kivágtuk. A mintákat tömegspektrometriai analízisre elküldtük Prof. Tózsér József (DE OEC, Proteomika Labor), illetve Dr. Klement Éva (MTA SZBK, Tömegspektrometriai Laboratórium) számára. A géldarabokat a szokásos módon (<http://donatello.ucsf.edu/ingel.html>) tripszinnel emésztették redukálás és alkilálás után 4 órán át, 37 °C-on. A foszfopeptid halászatot TiO₂-dal végezték Hlavanda és mtsai (2007) alapján. A foszfopeptid fragmenteket LC-MS/MS segítségével azonosították.

5.2.3.4 Kalpain B aktivitásmérés

Aktivitásméréshez a kalpain B-t PKA-val egy órán át, ERK1 és ERK2 enzimekkel két órán át foszforiláltuk. Kontroll (nem foszforilált) minták előállítására végeztük a fehérjéket azonos körülmények között inkubáltuk kináz hozzáadása nélkül. Ezt követően a mintákat Sephadex G-25 mini-oszlopra vittük gélszűrés céljából, amit előzetesen ekvilibráltunk (kalpain puffer + 1 mM benzamidin, 0,25 mM PMSF, 10 mM β-merkapto-etanol és 10 mM NaF). Az oszlopot a puffer 100 µl-es részleteivel mostuk, majd az első két frakciót összeöntöttük és az aktivitás méréséig jégen tartottuk. A minták kalpain B tartalmát SDS-PAGE-sel (Laemmli, 1970) és denzitométerrel ellenőriztük BSA standard alkalmazásával. A különböző kalpain preparátumok aktiválódását és aktivitását fluorimetrián, fluoreszcens szubsztrát felhasználásával; SDS-PAGE módszerrel, MAP2c szubsztrát alkalmazásával és autolízis alapján vizsgáltuk meg.

A fluorimetriás enzimaktivitás mérés Alexa és mtsai (2004) alapján történt fluoreszcens szubsztrát, LY-AMC (Sigma) hasítása által a DE OEC Biofizikai és Sejtbiológiai Intézetében található Fluorolog-3 (Jobin Yvon, Cedex France) fluoriméter segítségével. A gerjesztési hullámhossz 380 nm volt, a fénykibocsájtást 460 nm-en detektáltuk. A kísérletek 50 µl kalpain pufferben végeztük, amely 1 mM LY-AMC-t és 0,4-0,8 µM kalpain B-t is tartalmazott. A szabad Ca²⁺-koncentrációt 9 mM-ra illetve 19 mM-ra állítottuk be. A reakciót az enzim hozzáadásával indítottuk.

A MAP2c fehérje szubsztrát felhasználásával történő aktivitásmérést kis szabad Ca²⁺-koncentráció mellett végeztük Baki és mtsai (1996) alapján. A szabad Ca²⁺-koncentrációt

(50, 100, 350 és 2000 μM) EDTA-val állítottuk be és kalcium szelektív elektród segítségével ellenőriztük. A reakciót 80 μl kalpain pufferben végeztük 2 mM DTT, 10 mM NaF, 0,1 mg/ml MAP2c és 0,1-0,25 μM kalpain B jelenlétében. A reakciót CaCl_2 hozzáadásával indítottuk, majd meghatározott időközönként (0, 0,5, 1, 2, 4 és 6 perc) mintát vettünk úgy, hogy a reakcióközeg 15 μl -ét hozzáadtuk 50 mM EDTA-t tartalmazó 4x SDS-mintapufferhez, ami leállította a reakciót. A mintákat 3 percig főztük, 10 % SDS-PAGE-sel választottuk el (Laemmli, 1970), majd Coomassie Brilliant Blue R250 festést követően a megmaradó MAP2c sávok intenzitását denzitométerrel (BioRad Fluor-STM denzitométer, Multi-analyst szoftver, 1.1-es verzió) határoztuk meg.

Az autolízis vizsgálat során a kalpain B autokatalitikus hasítását vizsgáltuk Baki és mtsai (1996) alapján. A reakciót 50 μl kalpain pufferben végeztük, ami 2 mM DTT-t, 10 mM NaF-t és 25 μg kalpain B-t is tartalmazott. A reakciót CaCl_2 hozzáadásával indítottuk, a szabad Ca^{2+} -koncentrációt 19 mM-ra állítottuk be. A szabályos időközökben (0, 0,5, 1, 1,5 és 2 perc) vett mintákat SDS-PAGE-sel szeparáltuk (Laemmli, 1970), majd az emésztetlen 104 kDa méretű kalpain sávokat intenzitását denzitométerrel határoztuk meg a korábbiak szerint. Vizsgálataink során elvégeztük a radioaktív [³²P]-vel jelölt kalpain B autolízisét is, amelyet a minták SDS-PAGE analízisét követően a beszárított gél autoradiográfiájával detektáltunk.

5.2.4 Immunológiai módszerek

5.2.4.1 Poliklonális kalpain B ellenanyag tisztítása

Az anti-kalpain B szérumot felhasználás előtt ammónium-szulfátos kicsapással tisztítottuk Mark Page és Robin Thorpe leírása (2002) alapján. 1 ml szérumhoz 0,243 g NH_4SO_4 -et adtunk és jégen inkubáltuk 30 percig. Centrifugáltuk (14000 rpm, 10 perc, 4 °C), majd a felülúszó eltávolítását követően a csapadékot 0,5 ml 5 mM foszfát pufferben (pH 8,0) oldottuk fel. Dializáltuk 2x 1 órán át 500 ml 5 mM foszfát pufferben (pH 8,0), majd DEAE 52-cellulóz (Whatman) oszlopra vittük és 30 mM foszfát pufferrel (pH 8,0) mostuk. 1 ml-es frakciókat szedtünk, melyeket SDS-PAGE-sel (Laemmli, 1970) illetve Bradford-féle módszerrel (Bradford, 1976) ellenőriztünk. Ezután a tisztán IgG-t tartalmazó frakciókat összeöntöttük és 100 μl -ként szétporciózva -20 °C-on tároltuk. Az így tisztított szérumot dot blot kísérlettel ellenőriztük, majd immunprecipitációs és Western blot kísérletekhez használtuk fel.

5.2.4.2 Dot blot

A kísérlet során rekombináns kalpain B fehérjét különböző mennyiségekben (10 ng, 50 ng, 100 ng) cseppentettünk fel közvetlenül, elektroforetikus szétválasztás nélkül Hybond ECL nitrocellulóz membránra (Amersham Biosciences), majd a membránt blokkoló oldatban (5 % sovány tejport tartalmazó PBST-oldat) egy órán át rázattuk. A blokkolást követően egy-egy órán át inkubáltuk a tisztított kalpain B elleni elsődleges antitesttel, majd a torma peroxidázzal konjugált anti-nyúl másodlagos antitesttel (Sigma). Az antitestek hígításához 5 % sovány tejport tartalmazó PBST-t használtunk. A két antitesttel történő kezelés között a membránt 3x 10 percig mostuk PBST-vel, a második antitestet követően 2x 10 percig, majd 1x 10 percig végeztük a mosást PBST-vel, illetve PBS-sel. Az immunreakciót Supersignal West Pico kemilumineszcens szubsztráttal (Pierce) és Fuji RX röntgenfilm felhasználásával detektáltuk.

5.2.4.3 Western blot

A kísérleteink során kapott mintákat 10 % SDS-PAGE-sel (Laemmli, 1970) választottuk el fehérje standard (Fermentas) alkalmazása mellett Bio-Rad elektroforézis készülékben, majd Hybond ECL nitrocellulóz membránra (Amersham Biosciences) vittük át 100 V-on 90 percig Bio-Rad transzfer készüléket használva. Ezután a membrán szabad kötőhelyeit 5 % zsírszegény tejport tartalmazó PBST-vel blokkoltuk egy órán keresztül. A blokkolást követően a membránt mostuk, majd anti-kalpain B elsődleges antitesttel inkubáltuk egy éjszakán át 4 °C-on. A membránt 3x 10 percig mostuk PBST-vel, majd egy órát át inkubáltuk a torma peroxidázzal konjugált anti-nyúl másodlagos antitesttel (Sigma). A membránt 2x 10 percig PBST-vel, majd 1x 10 percig PBS-sel mostuk. Az immunreakciót Supersignal West Pico kemilumineszcencia előhívó oldattal (Pierce) detektáltuk Alpha Innotech készülékben. Az elsődleges és másodlagos antitestek hígításához 5 % zsírszegény tejport tartalmazó PBST-t használtunk.

5.2.4.4 Immunprecipitáció

Az immunprecipitációs kísérleteket Kiss és mtsai (2008) alapján végeztünk. A nem specifikus kötődések elkerülése végett az S2 sejtek kezelése, majd feltárása után kapott felülúszót előtisztítottuk 100 µl Protein A-Sepharose-zal (Sigma) 3-4 órán át, 4 °C-on történő

kevertetéssel, majd centrifugáltuk (14000 rpm, 10 perc, 4 °C). Ezzel párhuzamosan 50 µl Protein A-Sepharose-t inkubáltunk 40 µg affinitás kromatográfiával tisztított anti-kalpain B antitesttel lízis pufferben állandó keverés mellett, majd a gyantát centrifugálással (14000 rpm, 5 perc, 4 °C) gyűjtöttük össze. Az előtisztított lizátumot anti-kalpain B ellenanyaggal összekapcsolt Protein A-Sepharose-zal inkubáltunk egy éjszakán át 4 °C-on történő kevertetéssel. A gyantát háromszor mostuk 200 µl lízis pufferrel, majd 200 µl 1x SDS-mintapufferrel főztük 10 percig. Az így kapott minták egy részét Western blottal analizáltuk, másik részét tömegspektrometriai vizsgálatokra küldtük.

5.2.5 Adatok elemzése, kiértékelése

Az amplifikációhoz és a szekvenáláshoz felhasznált oligonukleotid primereket a pDraw32 program [URL: <http://www.acaclone.com>] segítségével terveztük. A restriktációs helyek jóslása szintén ezen program felhasználásával történt.

A DNS és fehérje szekvencia adatok összehasonlítását a ClustalW2 szoftver [URL: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>] segítségével végeztük el.

A filogenetikai - és szekvencia analízist a MEGA 4.1 szoftver [URL: <http://www.megasoftware.net>] alkalmazásával készítettük. A Neighbor Joining algoritmust alkalmaztuk az elemzések során.

A *Drosophila* kalpain B foszforilációs helyeit a Motif Scan (URL: http://scansite.mit.edu/motifscan_id.phtml) programmal, szerkezetét az IUPred szerverrel [URL: <http://iupred.enzim.hu>] analizáltuk.

Az enzimkinetikai adatok matematikai modellezését Dr. Takács Gábor (ELTE, Elméleti Fizikai Tanszék, Budapest) végezte a Kovács és mtsai (2009) cikkben leírtak szerint.

A *C. albicans* PPZ1 fehérje katalitikus doménjének homológ modellét Dr. Bagossi Péter (DE OEC Biokémia és Molekuláris Biológiai Intézet); a *Drosophila* kalpain B homológ modellét Dr. Bozóky Zoltán (MTA SZBK Enzimológiai Intézet) készítette.

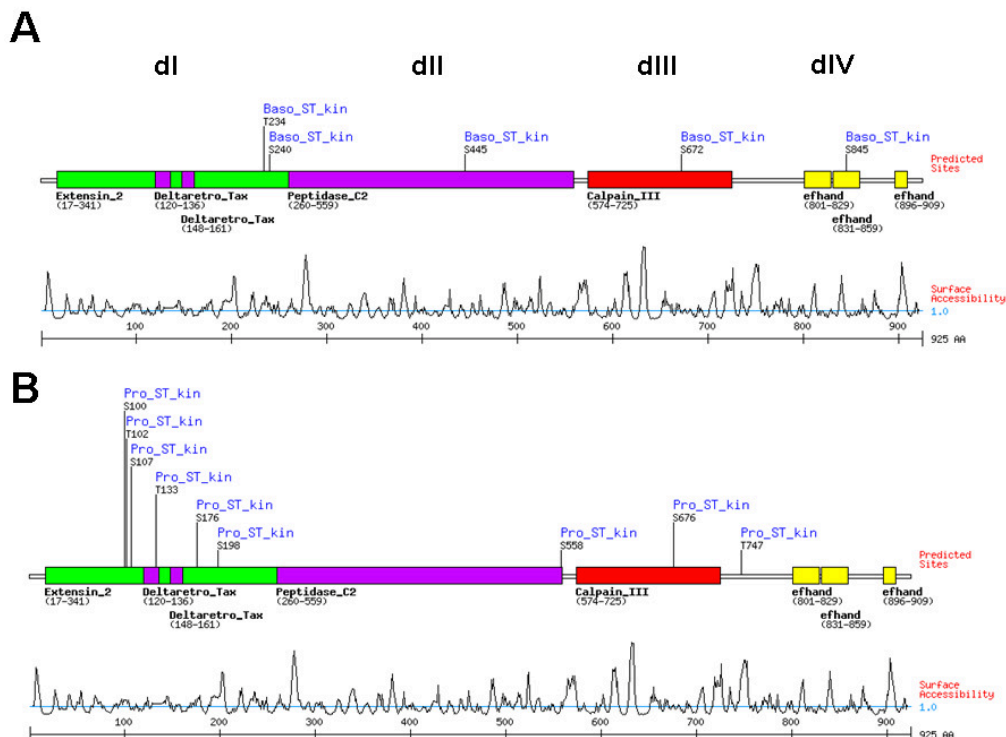
Az eredmények átlagának illetve szórásának meghatározásához az Excel szoftvert (Microsoft Corporation) használtuk.

6. EREDMÉNYEK

6.1 A *Drosophila melanogaster* kalpain B szabályozása foszforilációval

6.1.1 Rekombináns kalpain B *in vitro* foszforilációja

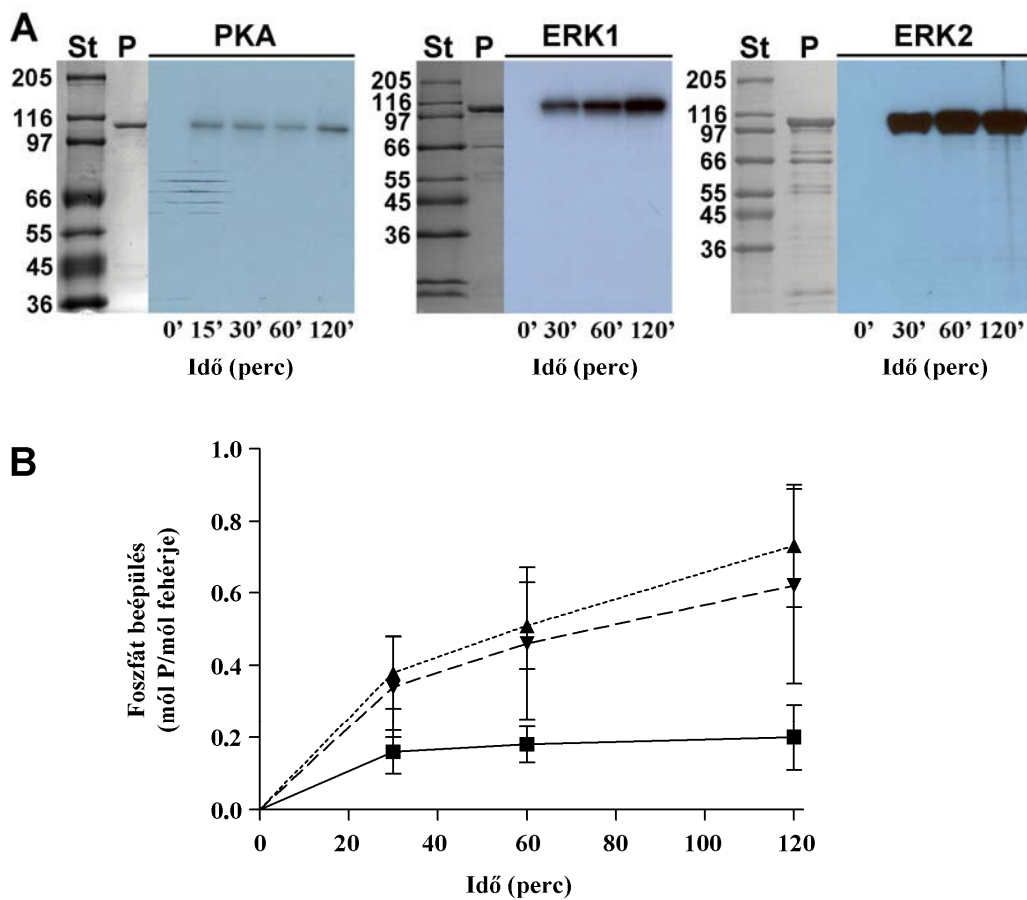
A *Drosophila* kalpainok foszforilációja korábban nem volt ismert. Ezért munkánk kezdetén elvégeztük a *Drosophila* kalpain B elsődleges szerkezetének bioinformatikai analízisét. A Motif Scan (http://scansite.mit.edu/motifscan_id.phtml) információi alapján alacsony fokú szigorúsági paraméterek között öt PKA és számos ERK foszforilációs hely jelenléte volt valószínűsíthető (7. ábra).



7. ábra. A kalpain B foszforilációs helyeinek jöslása

A kalpain B négy különböző doménje a dl, dII, dIII és dIV jelölést kapta. A jöslolt PKA (A) és ERK (B) foszforilációs helyek a felső paneleken láthatóak, míg az aminosavak felszíni hozzáférhetőségét az alsó panelek mutatják.

A szerkezeti jóslások bizonyítása érdekében elvégeztük a rekombináns kalpain B fehérje *in vitro* foszforilációját PKA, ERK1 és ERK2 enzimekkel [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP jelenlétében (8. ábra). Mindhárom enzim esetében azt kaptuk, hogy ha különböző mértékben is, de foszforilálják a kalpain B-t. A legkisebb mértékű hatást a PKA esetében kaptuk, az enzim $0,20 \pm 0,09$ (n=5) mól foszfátot épít be 1 mól fehérjébe. Az ERK enzimek ennél hatékonyabbnak bizonyultak, ugyanis az ERK1 $0,62 \pm 0,27$ (n=6) mól foszfátot, míg az ERK2 $0,73 \pm 0,17$ (n=7) mól foszfátot épít be 1 mól kalpain B fehérjébe (8/B. ábra).

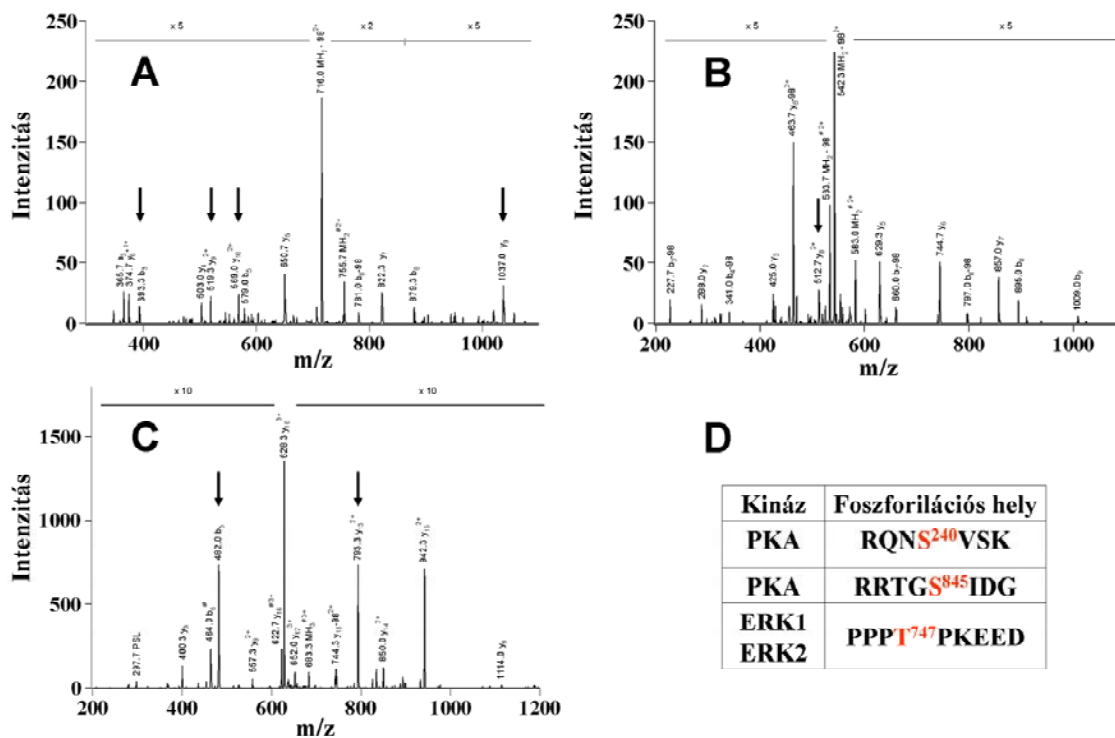


8. ábra. A kalpain B *in vitro* foszforilációja

(A) A rekombináns kalpain B fehérjét *in vitro* foszforiláltuk PKA, ERK1 és ERK2 enzimekkel [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP jelenlétében. A minták analízise SDS-PAGE-t követő autoradiográfiával történt. A panelek bal oldalán a fehérje standard (St) és 2 μg foszforilálatlan kalpain B fehérje (P) látható Coomassie Blue-val festve, a jobb oldalon a minták autoradiogramjai láthatóak. A mintavétel időpontját percben alul adtuk meg. (B) A foszforiláció (PKA - ■, ERK1 - ▼, ERK2 - ▲) követése a TCA-val kicsapott fehérjébe beépült radioaktivitás meghatározásával történt. A grafikonon hét független kísérlet eredményének átlagát \pm SD értéket tüntettük fel.

A minták SDS-PAGE-sel történő elválasztását követően autoradiográfiával azonosítottunk egy 104 kDa méretű sávot, amely a rekombináns kalpain B-nek felelt meg. Megállapítható tehát, hogy a foszfátcsoport csak a kalpain B fehérjébe épült be (8/A. ábra).

A foszforilációs hely(ek) azonosítása érdekében elvégeztük a foszforilációs kísérleteket az előzővel azonos körülmények között azzal az eltéréssel, hogy a $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ helyett nem radioaktív ATP-t használtunk a vad típusú aktív és a mutáns inaktív kalpain B fehérjék foszforilációja során. Az inaktív mutánst (Cys \rightarrow Ala csere a fehérje aktív centrumában) azért alkalmaztuk, hogy elkerüljük a fehérje autoproteolitikus degradációját a minta kezelése során. A reakciót követően a mintákat SDS-PAGE-sel szeparáltuk, a kalpain sávokat kivágtuk és tömegspektrometriai vizsgálatokra küldtük.



9. ábra. *In vitro* foszforilációs helyek azonosítása kalpain B fehérjében

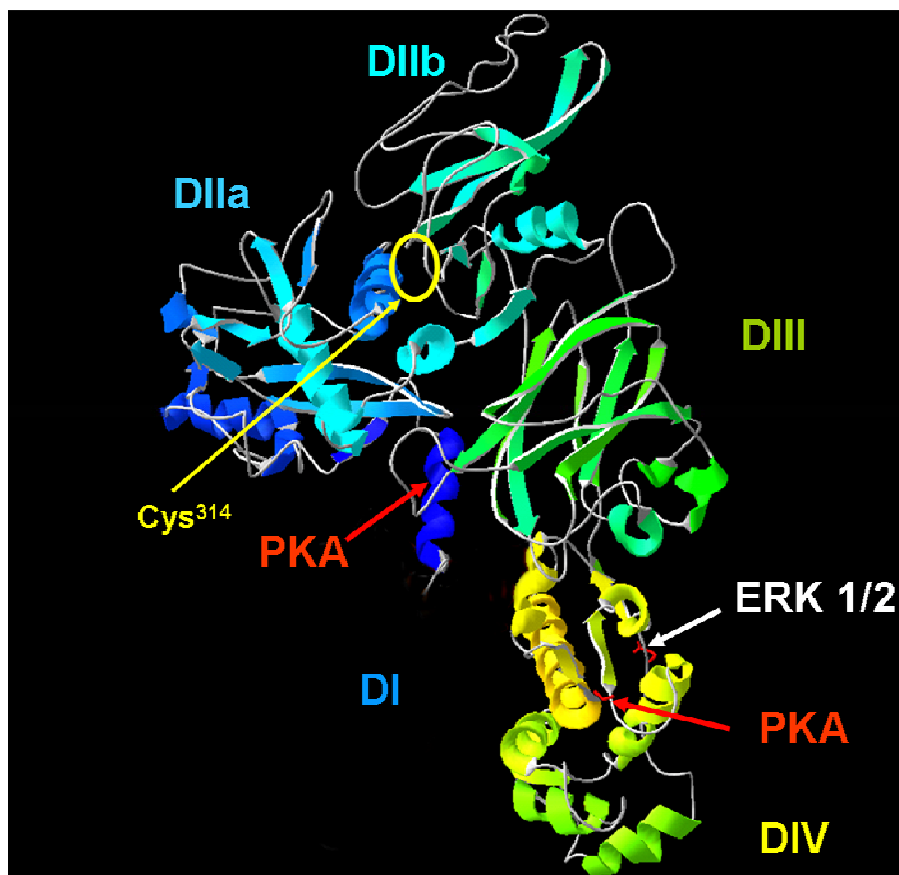
Az A, B és C ábrákon a tömegspektrometriai analízis során meghatározott foszforilációs helyekhez köthető CID spektrumok láthatóak: Ser240 (A), Ser845 (B) és Thr747 (C). A foszforilációs helyek azonosításához felhasznált csúcsokat nyílal jelöltük. A foszforilációs helyeket a (D) ábra foglalja össze. (Az ábra A, B és C része Dr. Klement Éva munkája.)

A foszfopeptid fragmentek LC-MS/MS analízise során kiderült (9. ábra), hogy a vad típusú kalpain B fehérjében a PKA a Ser240 és Ser845, míg az ERK1 és ERK2 enzimek

ugyanazon Thr747 aminosav oldalláncot foszforilálják. Az inaktív kalpain B vizsgálata során a Ser240 kivételével ugyanezeket a foszforilációs helyeket azonosítottuk.

6.1.2 A kalpain B foszforilációs helyeinek lokalizációja

A *Drosophila* kalpain B háromdimenziós szerkezete még nem ismert, így a humán m-kalpain atomi koordinátáit (Reverter és mtsai, 2001) felhasználva homológia modellezéssel határoztuk meg a foszforilációs helyek lokalizációját (10. ábra).



10. ábra. A *Drosophila* kalpain B homológ modellje

Sötétkék, kék, türkizkék, zöld és sárga színekkel jelöltük a kalpain B DI, DIIa, DIIb, DIII és DIV doménjeit. A rendezetlen szerkezetű DI domén nem volt modellezhető, csak az m-kalpainnal homológ része látható (DI). A DII domént két aldoménra bontottuk (DIIa és DIIb). Sárga karikával ábrázoltuk az aktív helyet, kiemelve az inaktív mutáns esetében módosított Cys314 aminosavat. Piros és fehér nyilak mutatják a PKA és ERK foszforilációs helyeket. (A homológ modellezést Dr. Bozóky Zoltán végezte.)

A Motif Scan szoftver előrejelzésével (7. ábra) összhangban azt kaptuk, hogy a Ser845-ös PKA hely a IV-es domén második EF-kéz motívumában (831-859 aminosav)

helyezkedik el. Ezt megelőzi két bázikus aminosav (Arg841 és Arg842), amelyek ideális környezetet biztosítanak a PKA enzim felismeréséhez (9/D. ábra). A második PKA hely, a Ser240 az I-es domén végén található, az aktivációs hasító hely közelében. Mivel a PKA számára ez a környezet kevésbé kedvelt, ezért ezt a pozíciót másodlagos PKA foszforilációs helynek neveztük el. Az ERK1 és ERK2 foszforilációs helyként azonosított Thr747 N-terminális oldalán három Pro található, amely az összes úgynevezett prolin-irányított szerin/treonin protein kináz felismerő helye (9/D. ábra). A Thr747 a III-as és a IV-es domén között elhelyezkedő úgynevezett transzducer régióban található (10. ábra), amelynek kulcsszerepe van az aktiválódásban, ugyanis ezen keresztül terjed a Ca^{2+} -jel a DIV Ca^{2+} -kötő doménról a DII katalitikus domén felé (Alexa és mtsai, 2004; Bozóky és mtsai, 2005).

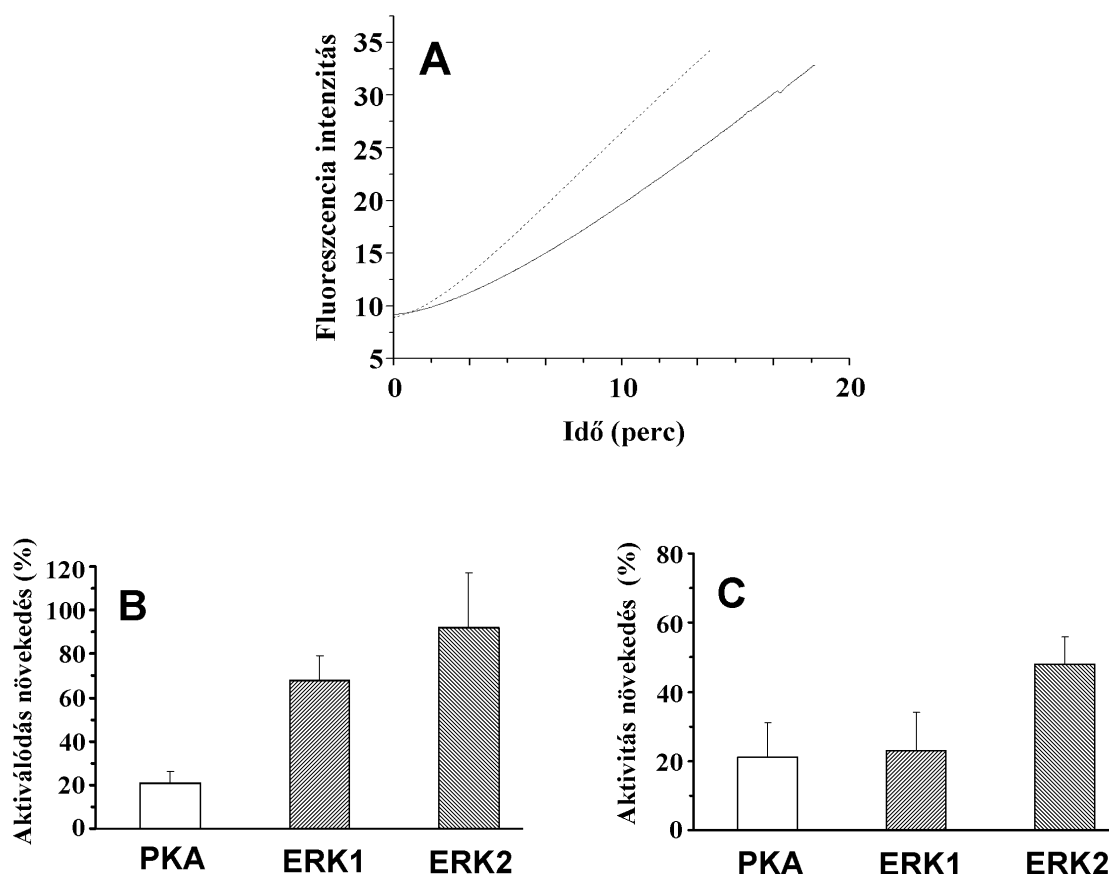
6.1.3 A foszforiláció hatása az enzim aktivitására és aktiválódására

A foszforilációs helyek lokalizációja azt sugallta, hogy a foszforilációnak szerepe lehet a kalpainok Ca^{2+} -ionok általi szabályozásában. Ezért kísérletes körülmények között megvizsgáltuk a foszforilált és a nem foszforilált (kontroll) enzimek kinetikai sajátosságait.

6.1.3.1 Fluorimetriás mérés peptid szubsztráttal

Az aktivitás mérése nagy Ca^{2+} -koncentráció mellett fluoreszcens dipeptid szubsztrát, N-szukcinil-Leu-Tyr-7-amino-4-metil-kumarin (LY-AMC) felhasználásával történt. Irodalmi adatok alapján tudtuk, hogy a kalpain B félmaximális aktiválódásához $8,6 \pm 0,8$ mM szabad Ca^{2+} -koncentráció szükséges (Alexa és mtsai, 2004). Ennek megfelelően 9 és 19 mM szabad Ca^{2+} -koncentrációnál az enzim 50 %, illetve 90 %-os hatékonysággal működik. Ilyen körülmények között a reakció eléggé gyors ahhoz, hogy elérje a maximális reakciósebességet (v_{max}). Ezt az értéket használtuk fel a foszforilált és a foszforilálatlan forma összehasonlításához.

Mindkét kinetikai görbe (11/A. ábra) lag fázissal indul, amely az autoproteolitikus aktiválódásnak felel meg, később a görbe kiegyenesedik, amint az enzim eléri maximális aktivitását. Látható, hogy a foszforilált enzim gyorsabban aktiválódik (11/B. ábra), illetve nagyobb az aktivitása (v_{max}) (11/C. ábra), mint a nem foszforilált enzimnek. Hasonló eredményeket kaptunk 9 mM és 19 mM szabad Ca^{2+} -koncentrációnál is. Látható az is, hogy ERK2 esetében kaptuk a legnagyobb aktivitás és aktiválódás növekedést, ami minden bizonnyal a magasabb foszforilációs szinttel magyarázható (11/B. és C. ábra)

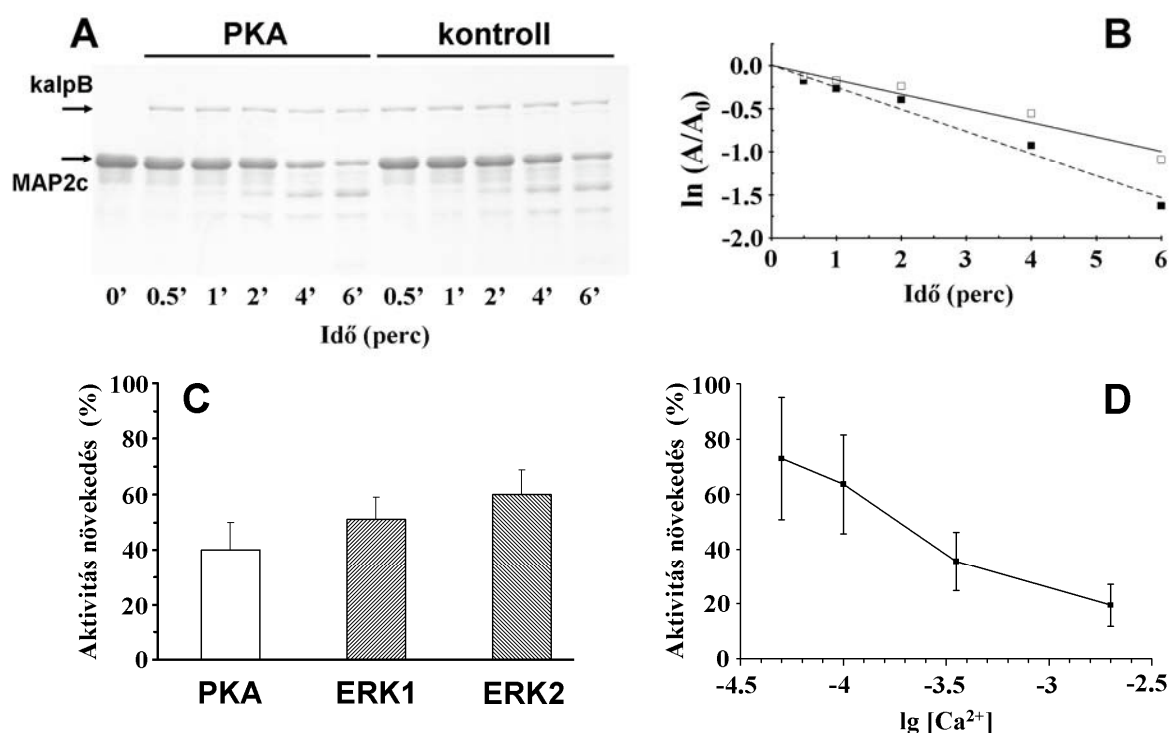


11. ábra. Kalpain B aktivitás mérése dipeptid szubsztráttal

Az ábra (A) részén a fluorimetriás aktivitásmérés során kapott görbék láthatóak. Egy példán keresztül mutatjuk be a foszforiláció hatását, jelen esetben egy PKA kezelés (szaggatott vonal) hatását a kontroll mintához (folytonos vonal) viszonyítva 9 mM szabad $[Ca^{2+}]$ jelenlétében. A kalpain B aktiválódási rátáját (k_{act}) illetve maximális reakciósebességét (v_{max}) a görbe alapján számoltuk. A foszforiláció hatására bekövetkező aktiválódás növekedést (B) és aktivitás növekedést (C) százalékban kifejezve adtuk meg a nem foszforilált kontrollhoz viszonyítva. A diagram 3-4 független kísérlet eredményének átlagát $\pm SD$ értéket mutatja.

6.1.3.2 Aktivitásmérés fehérje szubsztráttal

Ismeretes, hogy a MAP2c (mikrotubulushoz asszociált fehérje 2c) jó szubsztrátja a kalpainnak (Alexa és mtsai, 2002). A kísérleteink során MAP2c-t emésztettünk alacsony Ca^{2+} -koncentrációnál *Drosophila* kalpain B-vel, majd SDS-PAGE-t követően az épen maradó 62 kDa méretű MAP2c sáv intenzitását denzitométerrel határoztuk meg (12/A. ábra). Szemmel látható, hogy a foszforilált enzim gyorsabban emésztí a szubsztrátot, mint a nem foszforilált forma.



12. ábra. Kalpain B aktivitás mérése MAP2c szubszttráttal

(A) Egy példán keresztül mutatjuk be a MAP2c emésztését 50 μM szabad $[\text{Ca}^{2+}]$ mellett. A proteolízist PKA-val foszforilált és nem foszforilált (kontroll) kalpain B-vel végeztük, a reakciót SDS-PAGE módszerrel követtük. (B) A MAP2c fehérje sávok (alsó nyíl) intenzitását denzitometrállással határoztuk meg, melyből megállapítottuk a foszforilált (■) és nem foszforilált (□) enzim sebességi állandóját. (C) A foszforiláció hatására bekövetkező reakciósebesség növekedést százalékban kifejezve adtuk meg a nem foszforilált formához viszonyítva. A diagram 7-11 független kísérlet eredményének átlagát \pm SD értéket tünteti fel. A reakciót 350 μM szabad $[\text{Ca}^{2+}]$ jelenlétében végeztük. (D) A PKA foszforiláció hatását megvizsgáltuk a Ca^{2+} -koncentráció függvényében is. A szabad Ca^{2+} -koncentrációt mol/dm^3 -ben adtuk meg. A görbét 3-5 független kísérlet eredményének átlaga alapján szerkesztettük a szórások feltüntetésével.

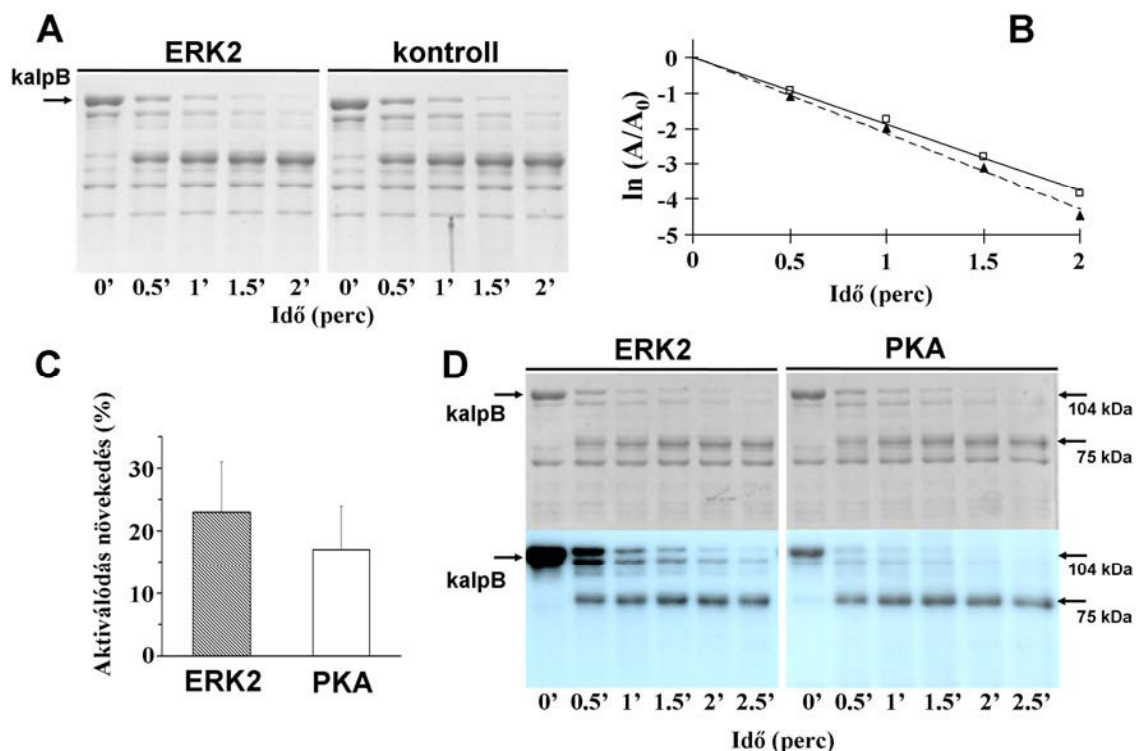
Elvégeztük az adatok kvantitatív analízisét is úgy, hogy az egyes mintavételi időpontokhoz rendelhető MAP2c sáv intenzitását elosztottuk a kiindulási intenzitással, ennek vettük természetes alapú logaritmusát $[\ln(A/A_0)]$, és ezt ábráztuk az idő függvényében, végül meghatároztuk a görbék meredekségét (12/B. ábra). Feltételezve, hogy az aktív enzim mennyisége konstans a reakció során, a meredekségből meghatározható az elsőrendű reakció sebességi állandója. Mi ezt az állandót használtuk fel az enzimaktivitás jellemzésére. A görbe alapján látható, hogy a foszforilált enzim aktívabb a nem foszforilálthoz képest. A grafikon alapján (12/C. ábra) pedig megállapítható, hogy ERK2 enzimmel történő foszforiláció hatására következett be a legnagyobb aktivitásnövekedés.

Kísérleteink során megvizsgáltuk a PKA hatás Ca^{2+} -függőségét is (12/D. ábra), és azt tapasztaltuk, hogy minél kisebb a Ca^{2+} -koncentráció, annál jobban érvényesül a PKA foszforiláció aktivitást növelő hatása. Ezzel a módszerrel azonban nem állt módunkban adatokat gyűjteni a reakció kezdeti szakaszáról, így a görbe nem volt alkalmas arra, hogy elemezzük a foszforiláció hatását a kalpain B aktiválódására.

6.1.3.3 Autolízis vizsgálat

Mivel az előző módszert nem tudtuk felhasználni annak megállapítására, hogy a foszforiláció miként befolyásolja a kalpain B aktiválódását/autolízisét, erre újabb módszert dolgoztunk ki. Módosított körülmények között, az emésztetlen, 104 kDa méretű kalpain B sáv eltűnését kísértük figyelemmel az idő függvényében (13/A. ábra) és a korábban leírtakhoz hasonlóan határoztuk meg a reakció sebességi állandóját (13/B. ábra). Feltételezésünk szerint a 224. és 225. aminosavak között létrejövő első autokatalitikus hasítás elegendő a fehérje aktiválódásához, így a 104 kDa méretű inaktív forma eltűnésének sebessége nagyjából arányos az aktiválás sebességével. A grafikon alapján (13/C. ábra) megállapítható, hogy ha kis mértékben is, de a foszforiláció hatására 19 mM szabad Ca^{2+} -koncentráció mellett gyorsabban aktiválódik a foszforilált enzim a nem foszforilált formához képest. A kísérleteket elvégeztük 1 mM szabad $[\text{Ca}^{2+}]$ -nál is, itt a hatás elhanyagolható volt.

Az autolízis vizsgálatot elvégeztük radioaktív $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ -vel foszforilált kalpain B fehérjével is, a radioaktív jel eloszlását pedig autoradiográfiával követtük (13/D. ábra). Annak ellenére, hogy az autolízis sebessége közel azonos volt a két kináz esetében ($k_{\text{ERK2}} = 0,039 \text{ s}^{-1}$ and $k_{\text{PKA}} = 0,034 \text{ s}^{-1}$), az autoradiogram teljesen más képet mutatott. A PKA által beépített radioaktív ^{32}P nagyon gyorsan eliminálódott a 104 kDa méretű sávból és a teljes radioaktivitásnak több mint 85%-a a 75 kDa méretű fragmentben halmozódott fel az autolízis első lépése után. A kalpain B aktivációs modellje szerint (Farkas és mtsai, 2004a) az utóbbi fragmentum a fehérje C-terminális részét képviseli. A radioaktivitás eloszlása összhangban van azon korábbi eredményünkkel, miszerint a kalpain B PKA foszforilációs helyei ezen a szakaszon belül helyezkednek el. Az ERK2 esetében azonban a beépített radioaktivitás körülbelül háromnegyed része eltűnik a gélből 30 másodpercen belül. A radioaktív ^{32}P -nak csak közelítőleg 21-26 %-a marad vissza a 75 kDa C-terminális proteolitikus részben. Feltételezésünk szerint a Thr747 mellett más aminosav(ak) is foszforilálódik(nak) a fehérje N-terminális rendezetlen régiójában (lásd 7. ábra), amely igen gyorsan degradálódik az autoproteolitikus aktiválás során.



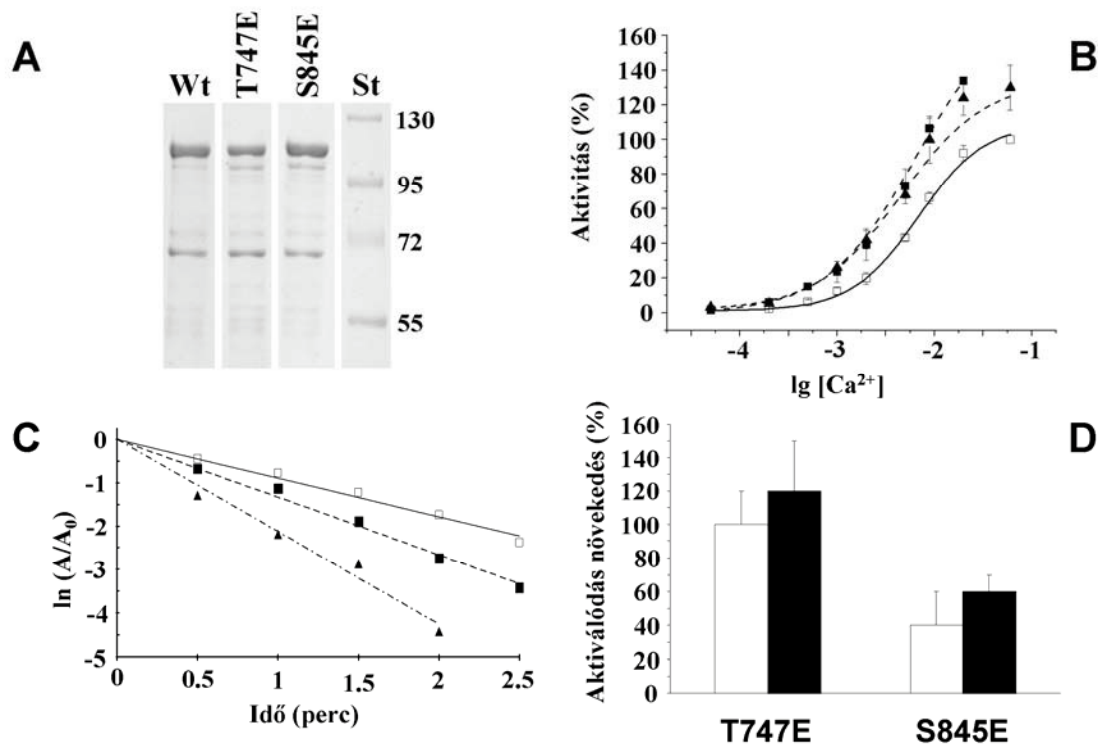
13. ábra. A kalpain B aktiválódásának követése autolízis alapján

Az ábra (A) részén a rekombináns kalpain B autolízisét mutatjuk be ERK2-vel való kezelést követően, illetve kezelés nélkül 19 mM Ca^{2+} -koncentrációnál. A folyamatot SDS-PAGE módszerrel követtük. (B) A 104 kDa méretű kalpain B sávok (nyíl) denzitometrálását követően meghatároztuk a fehérje eltűnésének sebességi állandóját (\blacktriangle - foszforilált, \square - nem foszforilált). (C) A foszforiláció hatására bekövetkező aktiválódás növekedést százalékban kifejezve adtuk meg a nem foszforilált formához viszonyítva. A diagram 3-4 független kísérlet eredményének átlagát \pm SD értéket mutatja. (D) $[\gamma^{32}P]ATP$ -tal történő foszforilálást követően a radioaktív jel eloszlása látható az autolízis során. A felső panelen SDS-PAGE-sel és Coomassie festéssel, az alsó panelen autoradiográfiával követtük a változásokat.

6.1.4 Mutáns kalpain B fehérjék vizsgálata

A foszforiláció hatásának vizsgálata során az eredmények magyarázata kissé bonyolultnak bizonyult, ugyanis a PKA esetében alacsony volt a foszforilációs szint, illetve az ERK esetében előfordulhatott olyan helyek foszforilációja is, amelyeket kísérleteink során nem sikerült azonosítanunk. Annak bizonyítása érdekében, hogy az általunk kimutatott foszforilációs helyeknek valóban szerepe van a kalpain B szabályozásában, Smith és mtsai (2003) eljárását követve elvégeztük az aktivitásméréseket foszforilációs hely mutánsokkal. Irányított mutagenézissel Dr. Alexa Anita (MTA, SZBK, Enzimológiai Intézet, Budapest) olyan mutánsokat (T747E és S845E) hozott létre, amelyekben az általunk foszforilációs

helyként azonosított Thr és Ser aminosavakat Glu-ra cserélte. A Glu negatív oldallánca imitálja a foszforiláció hatását. A módosítás helyének ismerete mellett a megközelítés előnye még, hogy a módosítás sztöchiometrikus és állandó. A kapott mutáns fehérjék tisztaságát SDS-PAGE módszerrel ellenőriztük. A gélek alapján látható volt, hogy az általunk vizsgált háromféle kalpain B tisztasága közel azonos (14/A. ábra).



14. ábra. Pontmutációk hatása a kalpain B aktivitására

(A) A vad típusú (Wt), a T747E (ERK hely) és az S845E (PKA hely) mutáns fehérjék tisztaságának vizsgálata SDS-PAGE módszerrel. St a fehérje létrát jelöli, a méreteket kDa-ban adtuk meg. (B) Enzimaktivitás vizsgálata különböző $[Ca^{2+}]$ -nál fluoreszcens LY-AMC szubsztrát felhasználásával. Vad típus (\square), T747E (\blacktriangle), S845E (\blacksquare). Az ábra nyolc független kísérlet eredményének átlagát \pm SD értéket mutatja. (C) A natív (\square) és a mutáns (\blacktriangle), (\blacksquare) fehérjék autolízisének vizsgálata SDS-PAGE módszerrel. (D) A mutációk hatása az enzim aktiválódására 19 mM szabad Ca^{2+} -koncentrációnál. Az aktiválódás növekedést százalékban adtuk meg a vad típushoz viszonyítva. Fehér oszlopok: fluoreszcencia mérés, fekete oszlopok: SDS-PAGE. A grafikon 3-7 független kísérlet eredményének átlagát \pm SD értéket tünteti fel.

A korábbiakhoz hasonlóan fluoreszcens módszerrel elvégeztük a mutáns enzimek aktivitásának kinetikai elemzését különböző Ca^{2+} -koncentrációnál (14/B. ábra). A vizsgálatok alapján megállapítottuk, hogy a mutációk széles $[Ca^{2+}]$ tartományban aktiválják a kalpain B-t, illetve, hogy a mutánsok alacsonyabb Ca^{2+} -koncentrációnál aktiválódnak, de

kevésbé érzékenyek a Ca^{2+} -koncentráció változására, mint a vad típusú enzim. A Ca^{2+} -függés matematikai elemzését az 3. táblázatban foglaltuk össze.

3. táblázat. Az enzimaktivitás $[\text{Ca}^{2+}]$ függésének kinetikai paraméterei

Kalpain B	$[\text{Ca}^{2+}]_{1/2}$ (mM)	A_{\max}	dx	Aktivitás növekedés magas $[\text{Ca}^{2+}]$ -nál	Aktivitás növekedés alacsony $[\text{Ca}^{2+}]$ -nál
Vad típus	$6,4 \pm 0,4$	110 ± 5	$0,34 \pm 0,02$	-	-
T747E	$5,5 \pm 0,8$	150 ± 12	$0,46 \pm 0,03$	$1,44 \pm 0,15$	$1,66 \pm 0,2$
S845E	$5,5 \pm 0,8$	170 ± 10	$0,44 \pm 0,03$	$1,86 \pm 0,25$	$2,3 \pm 0,15$

A $[\text{Ca}^{2+}]_{1/2}$ jelöli a félmaximális aktiválódáshoz szükséges Ca^{2+} -koncentrációt. A dx paraméter az aktivitást jellemzi a Ca^{2+} -koncentráció logaritmusának a függvényében. Ez egy olyan dimenzió nélküli mennyiség, amely megadja az enzimaktivitás érzékenységét a $[\text{Ca}^{2+}]_{1/2}$ érték körüli ionkoncentrációban bekövetkező kismértékű változásokra. A dx nagyobb értéke azt mutatja, hogy a mutánsok a Ca^{2+} -koncentrációban bekövetkező változásokra kevésbé érzékenyek.

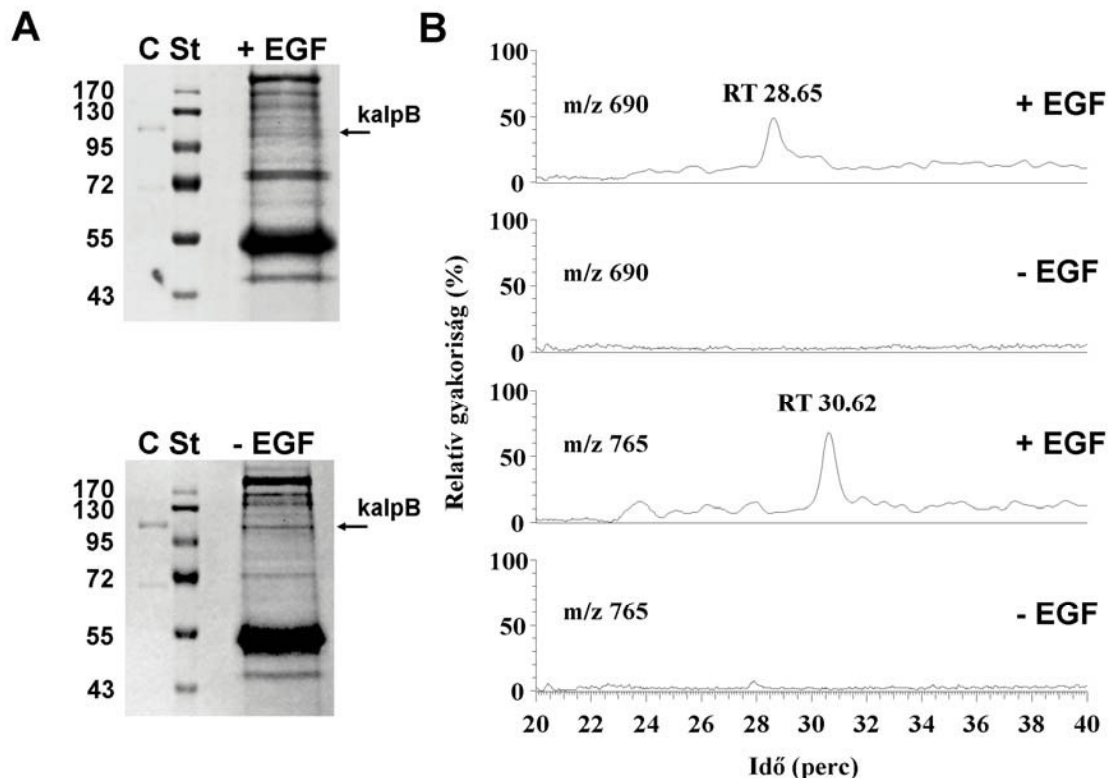
Megállapítottuk még, hogy bár a pontmutáció növelte a kalpain B Ca^{2+} -érzékenységét, a félmaximális aktiválódáshoz szükséges $[\text{Ca}^{2+}]$ még így is messze van a fiziológiai tartománytól. Elmondható az is, hogy mindkét mutáció növelte a maximális reakciósebességet és ez a hatás alacsony Ca^{2+} -koncentrációnál még kifejezettebben érvényesült.

Ezt követően megvizsgáltuk, hogy a mutációk miként hatnak az enzim autokatalitikus aktiválódására. A kísérletek során az ép 104 kDa méretű kalpain B sávjának eltűnését SDS-PAGE módszerrel és denzitométerrel követtük nyomon (14/C. ábra) a korábban leírtak szerint (lásd 13/A. és B. ábra). A kapott eredmények teljes mértékben összhangban voltak a fluoreszcens módszerrel kapott eredményekkel, amelyek szerint T747E mutáció nagyobb, míg az S845E mutáció kisebb aktiválódás növekedést okoz a vad típushoz képest (14/D. ábra).

6.1.5 Kalpain B *in vivo* foszforilációja

Miután *in vitro* körülmények között bebizonyítottuk, hogy a kalpain B foszforilálható, kíváncsiak voltunk a poszttranszlációs módosítás lehetséges élettani jelentőségére. Ezért *Drosophila* S2 sejtvonalon megvizsgáltuk, hogy a kalpain B foszforilálódik-e *in vivo*. Kontroll kísérletben kezeletlen sejtekből immunprecipitációval és SDS-PAGE-sel kalpain B fehérjét izoláltunk (15/A. ábra), majd tömegspektrometriai analízisre küldtük, hogy a

foszforilációs helyek állapotát feltérképezzük. Az MS/MS analízis során nem volt detektálható foszfopeptid (15/B. ábra), amiből arra a következtetésre jutottunk, hogy nyugvó sejtekben a kalpain B foszforilálatlan formában van jelen. Ugyanezt az eredményt kaptuk, amikor a sejteket foszfatáz inhibitorral, calyculin-A-val kezeltük. Ezt követően a sejteket kináz aktivátorokkal történő kezeléseknél vetettük alá és újra megvizsgáltuk a kalpain B foszforilációs állapotát.



15. ábra. A kalpain B in vivo foszforilációja

(A) A *Drosophila* S2 sejteket EGF-el és calyculin-A-val (+EGF) illetve ezek hozzáadása nélkül inkubáltuk (-EGF). Immunprecipitációt követően a fehérjéket SDS-PAGE módszerrel ellenőriztük. A gélképen a C jelölés 200 ng rekombináns kalpain B-t jelent. St a fehérje standardot jelöli, méretüket kDa-ban adtuk meg. (B) A tömegspektrometriai analízis során azonosított foszfopeptidek kromatogramjain az RT a retenciós időt jelöli. Az m/z 690 az Thr747-es ERK hely, az m/z 765 pedig a Ser240-es PKA hely azonosítására használt MS csúcsnak megfelelő kromatogramot mutatja. (Az ábra B része Dr. Klement Éva munkája.)

A MAP kináz/ERK útvonalat aktiváló epidermális növekedési faktorról és a calyculin-A-val történő együttes kezelés után azt tapasztaltuk, hogy az SDS-PAGE utáni gélfotón a kalpain B sávja kis mértékben kettévált (15. ábra). Feltételezésünk szerint ez a jelenség a fehérje poszttranszlációs módosításának az eredménye. Az MS vizsgálat alkalmával azonosított foszfopeptidek ion kromatogramjai (15/B. ábra) alapján látható, hogy a kalpain B

fehérjében a Thr747 és a Ser240 aminosav oldallánc foszforilálódott EGF kezelés hatására. A foszfopeptidek tömegspektrumai nagyon hasonlítanak az *in vitro* kísérletek során kapott spektrumokhoz (lásd 9/C. és 9/A.). Tehát kísérleteink során igazoltuk, hogy az általunk legfontosabb ERK1/ERK2 foszforilációs helynek tartott Thr747 oldallánc EGF kezelés hatására *in vivo* körülmények között foszforilálódik. Ugyanakkor meglepetéssel tapasztaltuk, hogy egy feltételezett PKA hely, a Ser240 oldallánc is foszforilálódott ERK kezelés hatására, noha ezt nem sikerült detektálnunk akkor, amikor az S2 sejteket *in vivo* forskolinnal és calyculin A-val kezeltük (nem dokumentált adat).

6.2 A *Candida albicans* protein foszfatáz Z1 gén polimorfizmusa

6.2.1 A *C. albicans* PPZ gén azonosítása

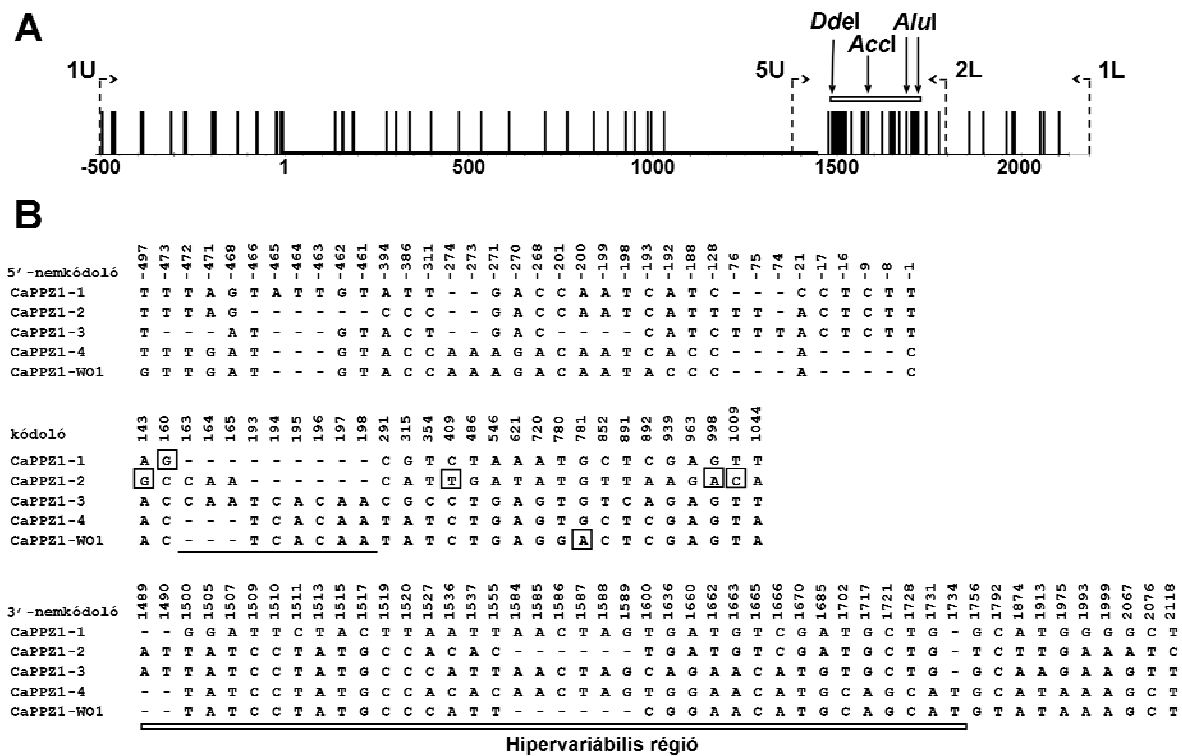
Az NCBI adatbázisában [URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore>] található információ alapján a *Candida albicans* SC5314 törzsben a szerin-treonin foszfatáz Z (PPZ) génnek két azonosítója van, a CaO19.726 (génbank azonosító: XM_707992) és a CaO19.8345 (génbank azonosító: XM_708015). Az adatbázisban szereplő információt, miszerint *C. albicans*-ban a protein foszfatáz Z-t kódoló gén egy kópiában fordul elő, Southern blot kísérlettel kívántuk megerősíteni. Ezért a fent említett szekvenciákat összehasonlítottuk a rendelkezésünkre álló *N. crassa pzl1*, *S. pombe pzh1*, illetve *S. cerevisiae PPZ1* és *PPZ2* gén szekvenciákkal. Megállapítottuk, hogy a munkacsoportunk által korábban klónozott *N. crassa pzl1* gén szekvenciája nagymértékben különbözik az adatbázisban található *C. albicans PPZ* szekvenciától, ugyanakkor a *C. albicans PPZ* gén nagy hasonlóságot mutatott a *S. cerevisiae PPZ1* és *PPZ2* génekkel. Így a *C. albicans PPZ1* azonosítására nem a rendelkezésünkre álló *N. crassa PZL-1* próbát, hanem egy *S. cerevisiae PPZ1* próbát használtunk, amit Prof. Joaquin Ariño munkacsoportjától szereztünk be. Kísérleteinkkel megerősítettük, hogy a *C. albicans*-ban egyetlen *PPZ1* gén van, amit *CaPPZ1*-nek neveztünk el.

6.2.2 A *CaPPZ1* gén polimorfizmusa

A *CaPPZ1* gén szekvenciája alapján tervezett primerek (*CaPPZ1U* és *CaPPZ1L*), valamint a *C. albicans* törzsekből izolált genomi DNS felhasználásával PCR segítségével amplifikáltuk, majd klónoztuk és szekvenáltattuk a gént tartalmazó kb. 2700 bázispár hosszúságú genomi DNS szakaszt.

A DNS szekvenciák analízise során megfigyeltünk, hogy az adatbázisban található (SC5314 törzsre vonatkozó) és az általunk meghatározott szekvenciák jelentős mértékben különböznek egymástól, ráadásul az általunk vizsgált ATCC 10231 tesztörzsből származó klónok két eltérő szekvenciával jellemezhető csoportot alkottak. Ezért egyetlen gombasejtből kiindulva kolóniákat növesztettünk fel, majd újra megvizsgáltuk a gén szekvenciákat. A kísérleteink során ismételten megtaláltuk a két allélnak megfelelő klónokat. Megállapítottuk, hogy az ATCC 10231-es törzs a *CaPPZ1* génre nézve heterozigóta és a két új szekvencia a diploid organizmus két új allélját képviseli (*CaPPZ1-2* és *CaPPZ1-3*). Ezért az adatbázisban található CaO19.726 szekvenciának a *CaPPZ1-1* allél nevet adtuk. Hasonló jelenséget

tapasztaltunk számos klinikai izolátumból származó *C. albicans* tenyészetben is, és a 9054-es vérminta esetében megtaláltuk a gén egy újabb allélját (*CaPPZ1-4*) (lásd 16. ábra). Az általunk azonosított új allélokat a *GQ357914*, *GQ357913*, *GQ357912* azonosítóval helyeztük az NCBI adatbázisba [URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/294459027>; [/294459025](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/294459025); [/294459023](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/294459023)].



16. ábra. A *CaPPZ1* gén polimorfizmusa

(A) A sematikus rajzon a polimorf helyek (függőleges vonalak) eloszlása látható a *CaPPZ1* gén kb. 2,7 kbp hosszúságú DNS szakaszán. A kódoló régiót tömör vonal, a hipervariábilis régiót nyitott sáv jelöli. A PCR primerek helyét szaggatott nyíllal, míg az allélspecifikus restriktációs enzimek felismerő helyeit folytonos nyíllal ábrázoltuk. (B) Három szekción látható az egyedi nukleotid eltérések és az inzerciók/deléción eloszlása a négy *CaPPZ1* allél és a *WO-1* variáns génjében. A számozás megegyezik a konszenzus szekvenciával. A kódoló régióban előforduló mutációkat bekereteztük, míg az in/del változásokat aláhúztuk. Az ábra szerkesztése során az következő génbank azonosítóval ellátott szekvenciákat használtuk: *CaO19.726*, *GQ357914*, *GQ357913*, *GQ357912* és *CAWG_01946.1*.

További vizsgálataink során homológia kutatással a *C. albicans* *WO-1* törzs esetében találtunk egy olyan gén szekvenciát, amely nagyon hasonló az általunk meghatározott *CaPPZ1-4* allélhoz, annak ellenére, hogy ezt korábban Ser/Thr protein foszfatáz PP1 γ katalitikus alegységeként írták le. Az öt teljes *CaPPZ1* szekvenciát összehasonlítottuk és azt

kaptuk, hogy az eltérések (nukleotidcsere, inzerció, delécio) mind a kódoló, mind a nem-kódoló régiókban előfordulnak (16. ábra).

A legnagyobb szekvencia eltéréseket a *CaPPZ1* gén 3'-nemkódoló régiójában találtuk. Ezek az eltérések olyan jellegzetes mintázatokat alkottak, amelyek alkalmasak voltak az allélok elkülönítésére. Ennek fényében összehasonlítottuk a *CaPPZ1* gén variabilitását hét olyan háztartási gén (*AAT1a*: aszpartát aminoszferáz, *ADP1*: ATP-függő permeáz, *ACC1*: acetil-koenzim-A karboxiláz, *MPIb*: mannóz-foszfát izomeráz, *SYA1*: alanil-tRNS szintetáz, *VPS13*: vakuoláris fehérje osztályozó fehérje és *ZWF1b*: glükóz-6-foszfát dehidrogenáz) variabilitásával, amelyeket korábban *C. albicans* minták genotipizálására használtak (Bougnoux és mtsai, 2002, 2003). A 4. táblázatban látható, hogy a *CaPPZ1* gén kódoló régiójának kisebb mértékű a variabilitása, mint a háztartási gének átlag variabilitása (2,90 %) (Bougnoux, 2003), azonban a 3'-nemkódoló régió az átlaghoz képest sokkal nagyobb változatosságot mutat (18,7 %).

4. táblázat. A *CaPPZ1* gén variabilitása

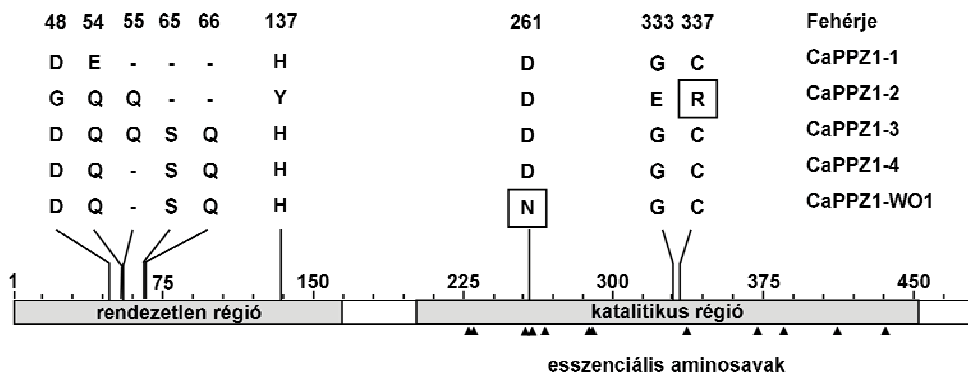
	Szekvenciák száma	Bázisok száma	Tranzíció	Transzverzió	Inzerció/delécio	Eltérő bázisok száma	Variabilitás (%)
<i>CaPPZ1</i> gén	5	2645	47	27	39	113	4,3
Kódoló régió	5	1457	14	6	9	29	2,0
Hipervariábilis régió	27	310	21	14	23	58	18,7

6.2.3 A genetikai polimorfizmus szerkezeti vonatkozásai

Homológia alapú modellezés segítségével következtetéseket szeretünk volna levonni azzal kapcsolatban, hogy a polimorfizmusnak milyen fehérjeszerkezeti vonatkozási lehetnek.

A *C. albicans* *PPZ1* gén terméke a többi PPZ fehérjéhez hasonlóan (Arino, 2002) két fő szerkezeti részből, az N-terminális regulátor doménből és a C-terminális katalitikus doménből áll (17. ábra). A gén kódoló régiójában található nukleotid eltérések (hat nukleotidcsere és három inszerció/delécio) következtében eltérések találhatóak a kódolt fehérjék aminosav sorrendjében is (17. ábra). A géntermék N-terminális részén három

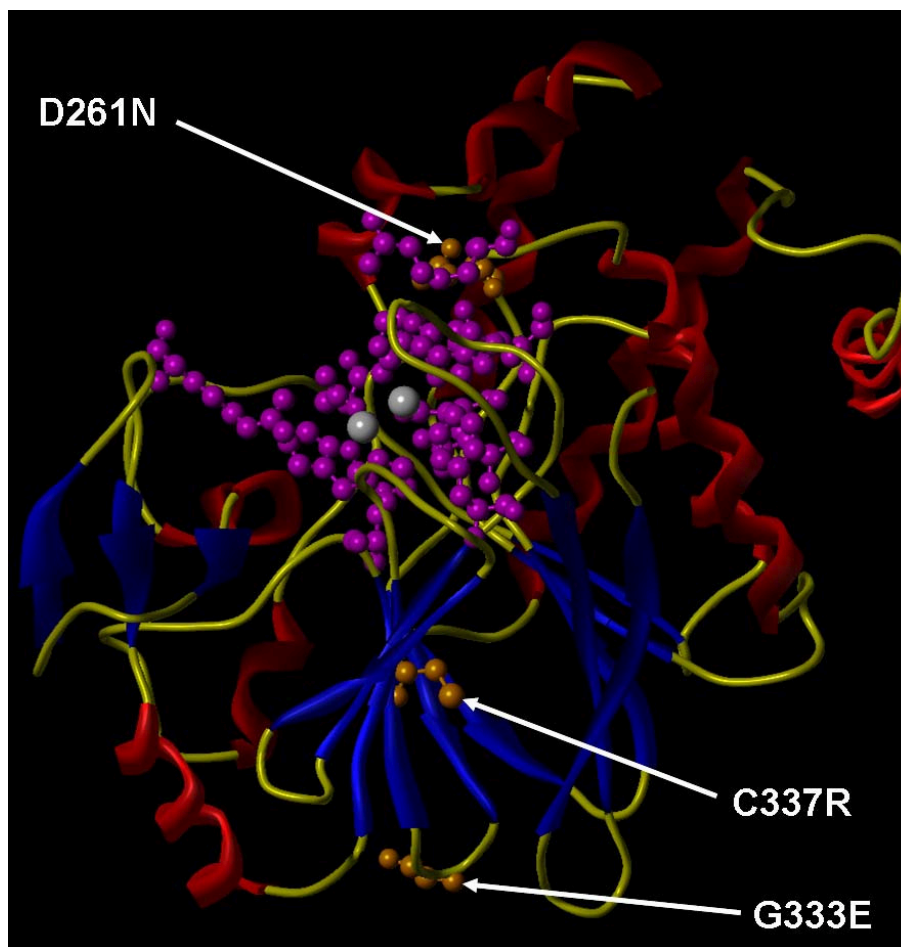
inzerciót azonosítottunk (Q55, S65 és Q66), amelyet a DNS polimeráz „megcsúsztása” okozhat az ismétlődő szakaszokon. A *CaPPZ1-1* allél esetében Q → E csere található az 54-es pozícióban, az első inzerciós hely közelében. A *CaPPZ1-2* allélban a Q55 inzerció mellett további négy specifikus aminosavcsere is fellelhető, kettő az N-terminális doménban (Q48G és H137Y) és kettő a C-terminális doménban (G333E and C337R).



17. ábra. A CaPPZ1 fehérje polimorfizmusa

A sematikus ábrán a leghosszabb *CaPPZ1-3* fehérje (485 aminosav) elsődleges szerkezete látható. Feltüntettük a fehérje rendezetlen N-terminális regulátor doménját és a globuláris C-terminális katalitikus doménját. A háromszögek az aktív hely esszenciális aminosavait jelölik. A polimorf aminosavak helyeit külön kiemeltük az ábra felső részén. Bekeretítettük azokat az aminosavcsereket, amelyek feltehetően befolyásolják az enzim aktivitását. Az aminosav maradékok számozása a *CaPPZ1-3* fehérje szekvenciája alapján történt.

Háromdimenziós szerkezet hiányában nem tudjuk megjósolni a polimorfizmus hatását a regulációs doménban. Ugyanakkor a PPZ enzim C-terminális katalitikus részének szerkezete hasonlít a protein foszfatáz 1 katalitikus alegységéhez (Arino, 2002), így a nyúl vázizom protein foszfatáz 1 (Goldberg és mtsai, 1995) atomi koordinátáit felhasználhatjuk a *CaPPZ1* izoformák homológia alapú modellezéséhez. A szerkezeti jóslás azt sugallja, hogy a katalitikus centrumhoz közel helyezkedő D261N aminosavcsere befolyásolhatja az enzim aktivitását, az enzim szerkezetét biztosító β -redők területén található C337R váltás módosíthatja az enzim stabilitását, míg a fehérje felszínén lévő G333E csere minden bizonnyal nincs hatással a foszfatáz működésére (18. ábra).



18. ábra. A *C. albicans* PPZ1 fehérje katalitikus doménjének homológ modellje

Pirossal az α -hélixet, kézzel a β -redőt, sárgával az összekötő régiót, szürkével az esszenciális fémionokat, lilával az aktív centrum kialakításában részt vevő aminosavakat, míg barnával az aminosavcsereket jelöltük. (A modellt Dr. Bagossi Péter készítette.)

Megállapítottuk azt is, hogy több jellegzetes különbség található a gén nemkódoló régióiban is, azonban ezen eltérések jelentőségére ez idáig nem derült fény.

6.2.4 Klinikai *C. albicans* izolátumok genotipizálása a CaPPZ1 gén hipervariábilis régiója alapján

A CaPPZ1 gén 3'-nemkódoló régiójában található nagymértékű szekvencia különbségekre alapozva úgy gondoltuk, hogy a CaPPZ1 gén hipervariábilis régiójának elemzése alkalmas lehet a klinikai mintákból származó *C. albicans* haplotípusok azonosítására. Hipotézisünk igazolása érdekében a DEOEC Orvosi Mikrobiológiai Intézetének *Candida* gyűjteményéből véletlenszerűen kiválasztottunk olyan *C. albicans*

izolátumokat, melyek hét szisztémás candidiasis-ban szenvedő betegből származtak. Mindegyik betegből két minta állt rendelkezésünkre, az egyik minta a fertőzés helyéről, a másik vérből származott (2. táblázat). Analizáltunk továbbá két olyan vérmintát (7111 és 9054) is, melyekhez nem tartozott a test más részéről származó minta.

Polimeráz láncreakcióban amplifikáltuk a *CaPPZI* gén kb. 420 bázispár nagyságú 3' hipervariábilis régióját CaPPZ5U és CaPPZ2L primerek, illetve a különböző *C. albicans* törzsekből preparált genomi DNS felhasználásával. Kísérleteink során kontrollként használtuk az ATCC 14053 tesztörzset, amely a *CaPPZI-1* allélra nézve homozigóta, a heterozigóta ATCC 10231 referencia törzset, amely a *CaPPZI-2* és *CaPPZI-3* allélokot hordozza, valamint a 9054 klinikai izolátumot, amelyben megtalálható a *CaPPZI-4* allél.

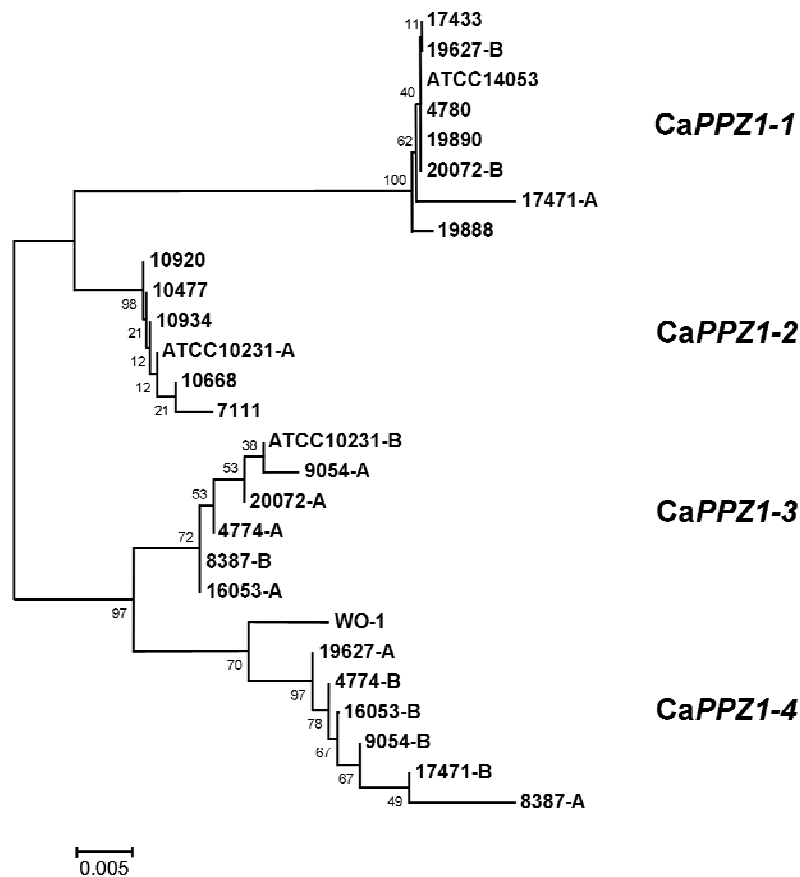
Kezdetben a PCR termékeket klónoztuk és szekvenáltattuk, azonban néhány esetben az amplikonok direkt szekvenálására is szükség volt az allélok egyértelmű azonosítása érdekében (lásd 6. táblázat). Az általunk meghatározott 26 db DNS részszekvenciát feltöltöttük az NCBI adatbázisba, a rájuk vonatkozó adatokat kiegészítve a WO-1 szekvenciával az 5. táblázatban foglaltuk össze.

5. táblázat A *CaPPZ1* gén 3'-hipervariábilis régióját tartalmazó DNS szekvenciák

NCBI génbank azonosító	<i>C. albicans</i> törzs	Allél típus
GQ487293	ATCC 14053	<i>CaPPZ1-1</i>
GQ487294	19890	<i>CaPPZ1-1</i>
GQ487295	19888	<i>CaPPZ1-1</i>
GQ487296	17433	<i>CaPPZ1-1</i>
GQ487297	17471-A	<i>CaPPZ1-1</i>
GQ487298	4780	<i>CaPPZ1-1</i>
GQ487299	20072-B	<i>CaPPZ1-1</i>
GQ487300	19627-B	<i>CaPPZ1-1</i>
GQ487301	10934	<i>CaPPZ1-2</i>
GQ487302	10920	<i>CaPPZ1-2</i>
GQ487303	10668	<i>CaPPZ1-2</i>
GQ487304	10477	<i>CaPPZ1-2</i>
GQ487305	4774-A	<i>CaPPZ1-3</i>
GQ487306	7111	<i>CaPPZ1-2</i>
GQ487307	ATCC 10231-A	<i>CaPPZ1-2</i>
GQ487308	ATCC 10231-B	<i>CaPPZ1-3</i>
GQ487309	9054-A	<i>CaPPZ1-3</i>
GQ487310	20072-A	<i>CaPPZ1-3</i>
GQ487311	8387-B	<i>CaPPZ1-3</i>
GQ487312	16053-A	<i>CaPPZ1-3</i>
GQ487313	4774-B	<i>CaPPZ1-4</i>
GQ487314	17471-B	<i>CaPPZ1-4</i>
GQ487315	16053-B	<i>CaPPZ1-4</i>
GQ487316	19627-A	<i>CaPPZ1-4</i>
GQ487317	8387-A	<i>CaPPZ1-4</i>
GQ487318	9054-B	<i>CaPPZ1-4</i>
CAWG_01946.1*	WO-1	<i>CaPPZ1-4</i>

*URL: http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/candida_group/MultiHome.html

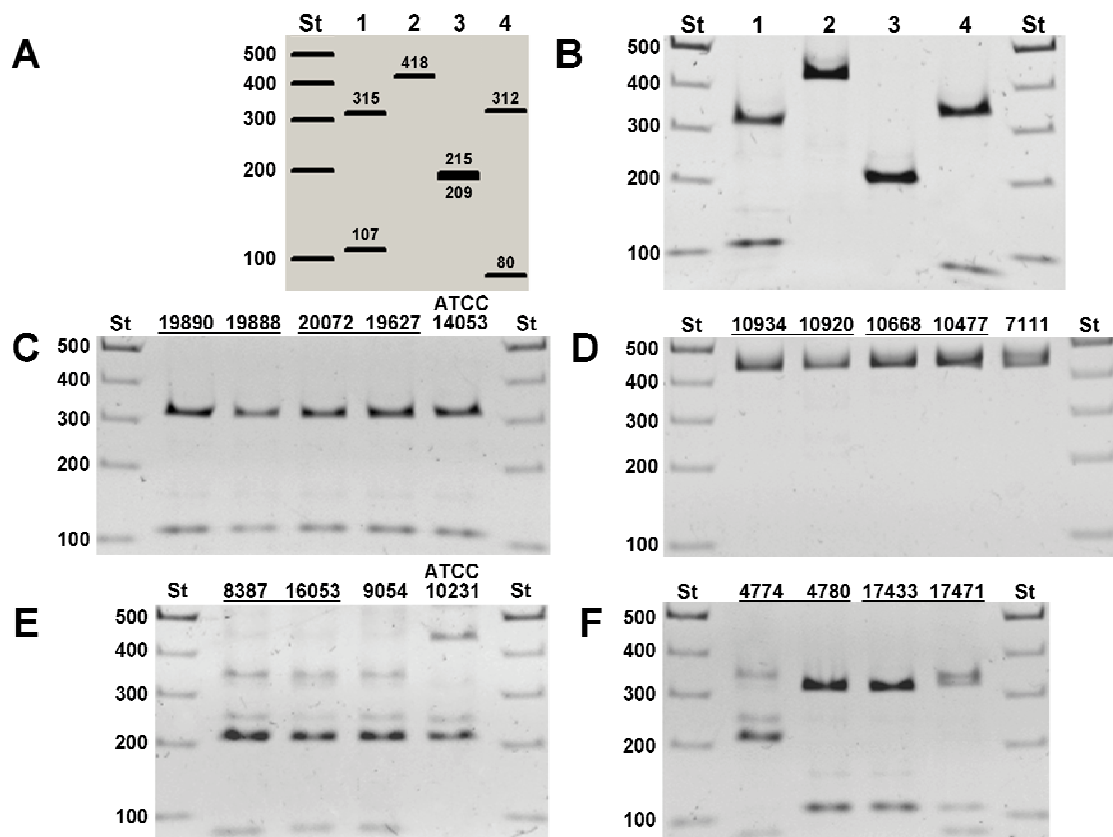
26 DNS fragmentum szekvenciáját valamint a WO-1 törzsből származó szekvenciát összehasonlítottuk, majd elemeztük a filogenetikai kapcsolatukat. A Mega 4.1 szoftver által szerkesztett családfát a 19. ábrán mutatjuk be. Néhány egyedi eltérés ellenére az összes DNS szekvenciát be tudtuk sorolni abba a négy kategóriába, amelyek megfelelnek annak a négy fő allélnak, amelyeket korábban a teljes hosszúságú genomi DNS klónok szekvenálásakor határoztunk meg (16. ábra).



19. ábra. A CaPPZ1 gén hipervariábilis régióinak filogenetikai elemzése

A két ATCC referencia törzsből és a 16 klinikai mintából származó általunk meghatározott 26 DNS szekvencia illetve a WO-1 gén szekvencia, tehát összesen 27 egymástól független DNS részszekvencia filogenetikai viszonya látható az ábrán. Amennyiben egy heterozigóta törzs esetében két különböző szekvenciát kaptunk, akkor az egyik szekvenciát A-val, a másikat B-vel jelöltük. A skála 0,5 % szekvencia eltérést jelöl, az elágazási pontokban a számok a bootstrap értéket mutatják százalékban kifejezve.

A DNS szekvenálás eredményét RFLP analízissel kívántuk megerősíteni (20. ábra). A szekvencia motívumok alapján olyan restriktív enzimeket választottunk, melyek az egyes allélokra nézve szekvencia specifikusak voltak. A *DdeI* enzim a CaPPZ1-1, az *AccI* a CaPPZ1-3, míg az *AluI* a CaPPZ1-4 allélra-re volt specifikus. Ennek következtében, ha a PCR termékeket a fent említett restriktív enzimek kombinációjával emésztjük, mind a négy allél esetében jellegzetes restriktív mintázatot várunk (20/A. ábra).



20. ábra. A CaPPZ1 gén hipervariábilis régiók RFLP analízise

Az (A) panelen a pDraw32 szoftver által jósolt, a (B) részen a klónozott kontroll plazmidok (19890/1, 10920/1, 16053/8 és 19627/15) hasítása során kapott allélokra jellemző restrikciós fragment mintázat látható. Az ábra (C-F) részei a kísérleteink során vizsgált tesztörzsek és klinikai minták RFLP mintázatát mutatják. A minták a (C) panelen a CaPPZ1-1 allélra, a (D) panelen a CaPPZ1-2 allélra nézve homozigóták. Az (E) részen a CaPPZ1-3 és CaPPZ1-4 allélokat hordozó heterozigóta klinikai minták és a CaPPZ1-2 valamint CaPPZ1-3 allélokkal rendelkező ATCC 10231 tesztörzs láthatóak. Az (F) panel olyan klinikai minták RFLP mintázatát mutatja, melyek feltehetően nozokomiális *C. albicans* fertőzésben szenvedő betegekből származtak.

Feltevésünket klónozott CaPPZ1 allélok emésztésével igazoltuk (20/B. ábra). Ezt követően elvégeztük a klinikai minták RFLP vizsgálatát, majd a kapott restrikciós fragment mintázatot (20/C-F. ábra) összevetettük a kontroll plazmidokéval. A sávok száma és mérete alapján meghatároztuk, hogy az adott minta mely allélt illetve allélokat tartalmazza. Azt tapasztaltuk, hogy a CaPPZ1-3 allélt tartalmazó minták esetében minden egyes alkalommal megjelent egy kb. 250 bp nagyságú gyenge sáv is az előzetesen megjósolt sávok mellett, habár ezt az enzim felismerő helyének ismerete alapján nem vártuk. Az 6. táblázat alapján látható, hogy a PCR ampliconok hasításával kapott restrikciós mintázat összhangban volt a szekvenálási adatokkal. Mindkét módszer alkalmazásával ugyanazt az eredményt kaptuk,

miszerint mindössze öt *CaPPZ1* allélkombináció detektálható az általunk vizsgált *C. albicans* törzsekben. Látható, hogy a *CaPPZ1-1* és a *CaPPZ1-2* a leggyakrabban előforduló allélok, míg a *CaPPZ1-3* és *CaPPZ1-4* allélok kevésbé gyakoriak és csak heterozigóta törzsekben jelennek meg (6. táblázat). Ha összehasonlítjuk az egy adott betegből származó törzsek genotípusát, akkor következtethetünk a fertőzés eredetére. Az allélok azonossága esetében endogén fertőzésről beszélhetünk, amikor is a beteg a saját *Candida* törzse által fertőződött, míg a különböző allélok minden bizonnyal külső fertőzésre utalnak. Az utóbbira két példát találtunk (4774-4780 és 17443-17471 minták).

6. táblázat. Klinikai mintákból származó *C. albicans* törzsek genotipizálása

Kódszám	Minta eredete	<i>PPZ1</i> allél (DNS szekvenálás)	<i>PPZ1</i> allél (RFLP)
19890	szövetváladék	1	1
19888	vér	1	1
20072	hasüreg	1*	1
19627	vér	1*	1
10934	tracheotómiai kanül	2	2
10920	vér	2	2
10668	szövetváladék	2	2
10477	vér	2	2
8387	szájüreg	3 és 4*	3 és 4
16053	vér	3 és 4	3 és 4
4774	vizelet	3 és 4	3 és 4
4780	vér	1	1
17433	tracheotómiai kanül	1	1
17471	vér	1 és 4*	1 és 4
9054	vér	3 és 4	3 és 4
7111	vér	2	2
ATCC 10231	-	2 és 3	2 és 3
ATCC 14053	-	1	1

* A PCR termék direkt szekvenálása alapján

Az egy betegből származó mintákat keretezéssel jelöltük.

7. DISZKUSSZIÓ

7.1 A *Drosophila melanogaster* kalpain B szabályozása foszforilációval

A kalpainokról korábban kimutatták, hogy Ca^{2+} -függő módon számos sejt folyamatban vesznek részt (Goll és mtsai, 2003; Friedrich és mtsai, 2004). A kalpain szupercsalád legjobban jellemzett tagjai a μ - és a m-kalpainok, ennek ellenére pontos szabályozásuk a mai napig nem ismert. Az aktiválódásukhoz szükséges kalciumion-koncentráció nagyságrendekkel magasabb a sejtek nyugalmi kalciumkoncentrációjánál (Cong, 1989), ami arra enged következtetni, hogy egyéb tényezők is befolyásolhatják az enzimet. Ilyen lehet a foszforiláció, amit korábban m-kalpainok esetében már leírtak (Glading és mtsai, 2004; Shihara és mtsai, 2002). Munkánk során a *Drosophila* kalpain B fehérjét tanulmányoztuk. Azért választottuk ezt a fehérjét, mert korábban már részletesen jellemezték (Friedrich és mtsai, 2004), illetve domén szerkezete nagyfokú hasonlóságot mutat az emlős m-kalpainnal. A *Drosophila* kalpainok foszforilációjáról korábban még nem született publikáció, ezért a lehetséges foszforilációs helyek megállapítása érdekében elemeztük a *Drosophila* kalpain B elsődleges szerkezetét. Az analízis számos potenciális PKA és ERK foszforilációs hely jelenlétét mutatta, ezért munkánk során *in vitro* és *in vivo* körülmények között megvizsgáltuk a *Drosophila melanogaster* kalpain B fehérje foszforilálhatóságát és a foszforiláció hatását az enzim aktivitására és aktiválódására.

Első körben radioaktív *in vitro* foszforilációs kísérletekkel bizonyítottuk, hogy a predikcióval összhangban a rekombináns kalpain B fehérje foszforilálható PKA, ERK1 és ERK2 enzimekkel. Az *in vitro* foszforiláció igazolása után szeretnénk volna megtudni, hogy a radioaktívan jelölt foszfátok a polipeptidlánc mely aminosav oldalláncjaihoz kapcsolódtak. Ezért a foszforilációs hely(ek) meghatározásának érdekében foszforilálatlan és nem radioaktív módon foszforilált inaktív és aktív kalpain B-ből mintákat készítettünk elő tömegspektrometriai analízisre. A vizsgálatok során három foszforilációs helyet sikerült azonosítani. Megállapítottuk, hogy a PKA esetében a Ser240 és Ser845, az ERK1/ERK2 enzimek esetében ugyanazon Thr747 aminosav oldalláncon történt a foszforiláció. Az *in vitro* foszforilációs helyek azonosítása volt az első lépés abban az irányban, hogy jobban megértsük a kalpain B szabályozását.

Ezek után kíváncsiak voltunk arra, hogy a foszforilációs helyek hol helyezkednek el a fehérje szerkezetén belül. Homológ modellezéssel megállapítottuk, hogy a Ser240 PKA hely

az I-es domén végén található, közel az aktivációs helyhez. A Ser845 PKA hely a IV. domén második EF-kéz motívumában helyezkedik el és befolyásolhatja az enzim Ca^{2+} -kötését. A Thr747 ERK hely a III. és a IV. domén között fekvő transzducer régióban foglal helyet, amelynek a Ca^{2+} -jel továbbításában tulajdonítanak szerepet. Tehát a modell alapján feltételezhető, hogy a PKA és ERK1/ERK2 enzimek által foszforilált aminosavak a molekula olyan régióiban foglalnak helyet, amelyek közvetve vagy közvetlenül szerepet játszanak az enzim aktivitásának és aktiválódásának szabályozásában. Összehasonlítva az emlős enzimekkel, a kalpain B foszforilációs helyeinek egyike sem található meg az μ - vagy m-kalpainban, de ennek igaz a fordítottja is, az emlős kalpainok esetében ismert foszforilációs helyek hiányoznak a muslica kalpain B enzimből. Mindent összevetve bebizonyítottuk, hogy a kalpain B foszforilálható három kinázzal három különböző aminosav oldalláncon és hogy ezek a helyek különböznek a már korábban emlős fehérjékben leírtaktól (Glading és mtsai, 2004; Shao és mtsai, 2006). Ennek következtében a *Drosophila* kalpain B szabályozása eltérhet a közismert emlős kalpainokétól.

Ezt követően három különböző módszert használtunk annak kiderítése érdekében, hogy a kalpain B foszforilációja miként befolyásolja az enzim aktiválódását és aktivitását. Minden esetben kontroll (nem foszforilált) mintához viszonyítottuk a kezelt (foszforilált) minták kinetikai sajátosságait. Először fluorimetriásan nagy Ca^{2+} -koncentráció és fluoreszcens dipeptid szubsztrát (LY-AMC) felhasználásával végeztünk méréseket. A kinetikai görbék elemzése során azt kaptuk, hogy a foszforilált forma egyrészt gyorsabban aktiválódik, másrészt az aktivitása is nagyobb, mint a nem foszforilált formának. A legnagyobb hatást az ERK2 esetében kaptuk. Ezután kis Ca^{2+} -koncentráció mellett egy fehérje szubsztrát (MAP2c) és SDS-PAGE módszer alkalmazásával nemcsak az enzimaktivitás változását, hanem a foszforiláció hatásának Ca^{2+} -függőségét is megvizsgáltuk. A kapott adatok kiértékelése után megállapítottuk, hogy a foszforilált enzim gyorsabban emésztette a szubsztrátot, tehát aktívabb volt, mint a nem foszforilált enzim. Ennél a módszernél is az ERK2 bizonyult a leghatékonyabbnak. Továbbá megfigyeltük, hogy alacsony Ca^{2+} -koncentrációnál jelentős szerepe van a PKA foszforilációnak, tehát a Ca^{2+} -koncentráció csökkenésével egyre jobban érvénye jut a poszttranszlációs módosítás aktivitást növelő hatása. Utoljára a kalpain B autolízisét nagy Ca^{2+} -koncentráció mellett SDS-PAGE módszerrel követtük nyomon. A kísérletek során két kérdésre kerestük a választ. Egyrészt hogyan hat a foszforiláció az enzim autolízisére, másrészt milyen lehet a radioaktív jelölés eloszlása az autolízis folyamán. Bár a foszforiláció hatása csupán kismértékű volt az enzim aktiválódására, de látható volt, hogy a foszforilált kalpain B gyorsabban aktiválódott, mint a

nem foszforilált enzim. A radioaktív vizsgálatok során pedig azt kaptuk, hogy amikor PKA-val foszforiláltuk a kalpain B fehérjét, akkor az autolízist követően a radioaktivitás legnagyobb része előzetes várakozásunknak megfelelően a keletkező C-terminális fragmentben halmozódott fel. Az ERK2 esetében meglepetéssel tapasztaltuk, hogy a beépített radioaktivitás mindössze egynegyed része maradt vissza ugyanezen fragmentumban, ami minden valószínűség szerint azzal magyarázható, hogy a fehérje degradálódott N-terminális részébe is történt foszfátbeépülés. Összességében megállapítható, hogy kináz kezelés hatására nő az enzim aktivitása valamint autoproteolitikus aktiválódásának a sebessége. A foszforiláció a proteáz Ca^{2+} -érzékenységét is fokozta. Minden esetben az ERK2 hatása bizonyult a legnagyobbnak, ami minden valószínűség szerint annak tudható be, hogy ez a kináz működött a leghatékonyabban, azaz az ERK2 építette be a legtöbb foszfátot a kalpain B-be.

A fluorimetriás méréseket, illetve az autolízis vizsgálatot foszforilációs hely mutáns (Thr747Glu és Ser845Glu) enzimekkel is elvégeztük. Erre azért volt szükség, mert bizonyítani akartuk, hogy ténylegesen a korábban meghatározott foszforilációs helyeken bekövetkező poszttranszlációs módosítások járulnak hozzá az enzim szabályozásához. A mutációk hatása nem függ a módosítás határfokától, minden esetben 100 %-os. Megállapítottuk, hogy a mutáció többféle módon is befolyásolja a fehérje működését. Egyrészt növelte a kalpain B Ca^{2+} -érzékenységét, illetve a reakció sebességét. Az aktivitásnövekedés nagyobb volt alacsony Ca^{2+} -koncentrációnál, amiből arra lehet következtetni, hogy a foszforiláció hatása markánsabb lehet a fiziológiai körülményekhez közel lévő Ca^{2+} -koncentrációnál. Másrészt kimutattuk, hogy a vad típusú enzimhez képest a mutánsok alacsonyabb Ca^{2+} -koncentrációnál aktiválódnak, továbbá kevésbé érzékenyek a Ca^{2+} -koncentráció változására. Az ERK mutáns esetében a hatás kifejezettebb volt, mint a PKA mutáns esetében. Az autolízis vizsgálatok során azt kaptuk, hogy mindkét mutáns esetében hamarabb következett be az autolízis, bár a T747E mutáció nagyobb aktiválódás növekedést okozott. A fluoreszcens és az SDS-PAGE módszerrel kapott eredmények teljes mértékben összhangban voltak. Nyilvánvaló, hogy a Glu mutációk és a Ser vagy Thr oldalláncokon történő foszforiláció nem teljesen egyenértékű módosítás, ennek ellenére a vizsgált mutáns fehérjék megerősítik a foszforilált fehérjékkel elért eredményeinket.

A szerkezeti jóslások és rekombináns fehérjékkel történő *in vitro* kísérletek olyan biokémiai lehetséges mechanizmusokat tárnak fel előttünk, amelyek nem feltétlenül működnek egy élő szervezetben. Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk az *in vitro* eredményeink lehetséges fiziológiai jelentőségét, S2 *Drosophila* sejtvonalon teszteltük a kalpain B foszforilálhatóságát. A kísérletek során a foszforilációs jelpályákat EGF és

forskolin aktivátorokkal stimuláltuk, majd az immunprecipitáció során nyert kalpain mintákat tömegspektrometriával vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy EGF-fel stimulált S2 sejtekben a fehérje transzducer régiójában található Thr747, illetve az I. doménben elhelyezkedő Ser240 oldallánc foszforilációja következik be. A PKA hely foszforilációjára nem számítottunk, főleg annak a fényében, hogy a PKA jelátviteli útvonalat aktiváló forskolin kezelés hatására nem volt tömegspektrometriával kimutatható foszforiláció. Nyilvánvaló, hogy a MAP kináz jelátviteli útvonal aktiválódása sokkal hatékonyabb, mint a PKA útvonal önmagában. Ugyanakkor a két útvonal interakcióját sem lehet kizárni, de akkor felmerül a kérdés, hogy miért nem az elsődleges Ser845 PKA hely foszforilálódik. A legvalószínűbb magyarázat az, hogy a Ser240 nem a PKA által, hanem másik kináz által foszforilálódik az élő sejtben. Szerkezeti jóslások alapján a Ser240-et közrefogó szekvencia kedvelt célpontja a CaMKII kináznak is. Így lehetséges, hogy EGF kezelés hatására az EGF-indukált Ca^{2+} -beáramlás következtében ez utóbbi kináz aktiválódik (Moolenaar és mtsai, 1986) és foszforilálja a Ser240-et. Hogy még komplikáltabb legyen a dolog, a jóslások alapján a CaMKII képes foszforilálni a Ser845-öt is, igaz kisebb hatékonysággal. Ezt azonban nem sikerült detektálni *in vivo* kísérleteink során. Mindent összevetve, az élő sejtekben a Ser240 foszforilációja is bekövetkezhet és hozzájárulhat a kalpain B szabályozásához. Azonban ezt a folyamatot valószínűleg nem a PKA katalizálja. Az viszont egyértelműen kimondható, hogy az ERK enzimek *in vitro* és *in vivo* körülmények között foszforilálják a Thr747-et.

Eredményeink azt sugallják, hogy az extracelluláris jel hatására aktiválódó MAP kináz/ERK útvonal - egyéb más változások mellett - a *Drosophila melanogaster* kalpain B foszforilációját és ennek következtében aktiválódását eredményezi. Feltételezésünk szerint a kalpain B szabályozása muslicában minden bizonnyal különbözik az emlősökben megtalálható homológétól, ugyanis a foszforilációs helyek elhelyezkedése nem konzerválódott az evolúció során. Eredményeink felhívják a figyelmet arra, hogy két fehérje elsődleges szerkezetének hasonlósága még nem garancia az azonos funkciók ellátására, ugyanis az egy-két aminosavat érintő látszólag kis mértékű változások is fontosak a reguláció szempontjából.

7.2 A *Candida albicans* protein foszfatáz Z1 gén polimorfizmusa

Munkánk során a *Candida albicans* genomjában található protein foszfatáz Z1 (*CaPPZ1*) gént vizsgáltuk, amely egy gombaszpecifikus szabályozó enzimet kódol (Jones és mtsai, 2004). A PPZ a foszfoprotein foszfatáz (PPP) enzimes család egy új tagja, amelyet

először *Saccharomyces cerevisiae*-ben írtak le (Posas és mtsai, 1992). Az irodalmi adatok és adatbázisban szereplő információk alapján tudjuk, hogy a PPZ enzimet kódoló gének csak gombákban fordulnak elő, továbbá ismert, hogy a *Candida albicans*-ban egyetlen protein foszfatáz Z-t kódoló gén van. Munkánk kezdetén Southern hibridizációval megerősítettük, hogy a *C. albicans*-ban egyetlen protein foszfatáz Z1 enzimet kódoló gén található, amit CaPPZ1-nek neveztünk el.

A *C. albicans* SC5314 és WO-1 törzsek genomjának szekvenálása alátámasztotta a diploid szervezet heterozigóta jellegét (Jones és mtsai, 2004), [http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/candida_group/Info.html]. A genetikai polimorfizmus egy adott olvasási kereten belül (ORF) többféle fehérjét eredményezhet, amelyek különbözhetnek aminosav sorrendjükben. Következésképpen szignifikánsan nőhet a genom által kódolt fehérjék száma. Továbbá a gének szabályozó régióiban bekövetkező polimorfizmusok különböző módon befolyásolhatják a gének expresszióját. Ezért a CaPPZ1 gén polimorfizmusát részletesen tanulmányoztuk referencia és klinikai minták felhasználásával.

Annak ellenére, hogy *C. albicans*-ban csak egy PPZ1 gén található, a gén klónozása és szekvenálása után számos egymástól eltérő génszekvenciát tudtunk meghatározni. Ezek a szekvenciák több ponton egymástól és az adatbázisban lévő szekvenciáktól is eltéréseket mutattak. Különbségeket kaptunk akkor is, amikor egy adott törzsből származó klónok szekvenciáit elemeztük. Ezért ATCC 10231 referencia törzsből különálló *C. albicans* sejteket izoláltunk és egyetlen sejtől növeltünk fel szubkultúrákat, melyekből molekuláris klónozás után nyert szekvencia részletek egyértelműen két csoportba tudtuk osztani. Tehát igazoltuk, hogy a vizsgált diploid törzs heterozigóta, az általunk kimutatott két új allélt pedig a CaPPZ1-2 és CaPPZ1-3 jelzővel láttuk el. Az adatbázisban elérhető CaO19.726 szekvencia kapta a CaPPZ1-1 nevet. Egy klinikai mintában (9054) egy negyedik allélt is azonosítottunk, amit CaPPZ1-4-nek neveztünk el. Kísérleteink során bebizonyosodott, hogy a kontroll törzsben kimutatott szekvencia változatosságok a klinikai gyakorlatból származó mintákban is előfordulnak. Az egyes allélok közötti különbségek és az egyes izolátumok heterogenitása együttesen járul hozzá a *C. albicans* nagyfokú genetikai polimorfizmusához. Annak meghatározása érdekében, hogy hol helyezkednek el ezek az eltérések a gén szekvenciájában, összehasonlítottuk az előbb említett négy allél szekvenciáját. Megállapítottuk, hogy a nukleotidcserék megtalálhatóak a CaPPZ1 gén kódoló és a nemkódoló régiójában is, illetve a gén STOP kodon utáni 3'-nemkódoló régiója nagyfokú variabilitást mutat. A gén 3'-nemkódoló hipervariábilis régióján belül elhelyezkedő körülbelül 310 nukleotid hosszúságú szakaszt elemezve arra a következtetésre jutottunk, hogy ez a régió jellegzetes

szekvenciamotívumainak köszönhetően felhasználható lehet a fő allélok megkülönböztetésére. Kíváncsiak voltunk arra, hogy az általunk vizsgált gén változatossága hogyan viszonyul más, állandó expressziós szinttel rendelkező gének variabilitásához. Az összehasonlítás során választásunk olyan háztartási génekre esett, amelyeket *C. albicans* izolátumok genotipizálására használtak (Bougnoux és mtsai, 2002, 2003). Az összehasonlító analízis során azt kaptuk, hogy a *CaPPZI* gén STOP kodon utáni régió variabilitása (18,7 %) többszöröse a háztartási gének átlagos variabilitásának (2,90 %).

Összesen kilenc aminosavcsere-találtunk a PPZ1 fehérjék elsődleges szerkezetének összehasonlítása során a kódoló régióban található nukleotid különbségek miatt. A PPZ rendezetlen N-terminális regulációs doménjéről nem áll rendelkezésünkre 3D-s szerkezet, így nem tudjuk megjósolni a polimorfizmus hatását. Viszont homológ modellezéssel sikerült megalkotni a fehérje C-terminális katalitikus doménjének szerkezetét, amely alapján megállapítottuk, hogy a három aminosavcsere közül az egyik minden valószínűség szerint hatással van az enzim aktivitására, a másik eltérés módosíthatja az enzim stabilitását, míg a harmadik különbség nem okoz lényeges változást. A *CaPPZI* gén 5'- és 3'-nemkódoló régióiban található számtalan nukleotid különbség jelentőségét nem ismerjük, bár ezek a változások hozzájárulhatnak a génexpresszió módosításához. Ezzel összhangban DNS chip-pel nemrég kimutatták, hogy RPMI 1640 tápfolyadékban zajló tenyésztésük során másképpen expresszálódott a *CaPPZI* foszfatáz gén a négy fő klád tagjaiban (MacCallum és mtsai., 2009). Összegzésképpen elmondható, a *CaPPZI* gén példája megerősíti, hogy a heterozigótaság, a különböző allélkombinációk és a szórványos pontmutációk okozta mikrovariabilitás fokozza a széles körben elterjedt opportunistá patogén gomba génkészletének sokoldalúságát, illetve genetikai divergenciáját (Larriba és Calderone, 2008).

Mivel a legnagyobb szekvencia eltéréseket a *CaPPZI* gén 3'-nemkódoló régiójában találtuk, munkánk következő fázisában ezt a hipervariábilis régiót analizáltuk. Megvizsgáltuk a hipervariábilis régióban felismert jellegzetes szekvencia eltérések felhasználhatóságát *C. albicans* klinikai izolátumok genotipizálására. Ennek tesztelésére olyan klinikai törzseket választottunk ki, amelyek egy adott beteg véréből illetve a fertőzött szövetéből származtak. A minták analízisét többféleképpen végeztük el: szekvenáltattuk az amplifikált és klónozott hipervariábilis régiót, közvetlenül a PCR terméket szekvenáltattuk illetve RFLP-vel vizsgáltuk a PCR amplikont. Az adatok kiértékelésekor azt tapasztaltuk, hogy a kapott szekvenciák minden egyes esetben megfeleltek a már korábban azonosított allélok valamelyikének. Továbbá megfigyeltük, hogy az allélok változatos kombinációban jelentek meg az egyes klinikai mintákban. Kimutattuk, hogy öt *CaPPZI* allélkombináció fordult elő az

általunk vizsgált izolátumokban. Ezek közül tizenegy minta homozigóta, öt minta heterozigóta volt a *CaPPZI* génre nézve. A *CaPPZI-1* és a *CaPPZI-2* allélok mind a homozigóta, mind a heterozigóta törzsekben előfordultak, a *CaPPZI-3* és *CaPPZI-4* allélok csak heterozigóta törzsekben jelentek meg. Figyelemre méltó, hogy az ATCC14053 tesztörzs és számos klinikai izolátum homozigóta a *CaPPZI-1* allélra. Mivel szekvenciájuk nagymértékben hasonlít a SC5314 törzs génszekvenciájára, azt gondoljuk, hogy mindegyikük besorolható a leggyakoribb kládként számon tartott 1-es kládba (Odds és Jacobsen, 2008). Másrészt nem találtunk egyetlen olyan törzset sem, amely homozigóta lett volna a *CaPPZI-4* allélra, ami azt sugallja, hogy a kevésbé gyakori 6-os klád, melyet a WO-1 képvisel, hiányzott a mi gyűjteményünkből.

Egy korábbi tanulmány során tizenegy beteget vizsgáltak MLST (multilocus szekvencia tipizálás) módszerrel. A minták egy adott páciens esetében a vérből és a fertőzés helyéről származtak és azt találták, hogy mindegyik beteg a saját maga kommenzalista törzsével volt fertőzve (Odds és mtsai, 2006). A legtöbb eredményünk összhangban van ezzel az elképzeléssel. Két páciensnél azonban azt kaptuk, hogy nem egyezett a vérből és a fertőzés helyéről származó izolátum genotípusa. Az egyik esetben (4774 ill. 4780) a beteg minden valószínűség szerint egy genetikailag független törzstől nozokomiális fertőzéssel esett át. A másik eset (17433 ill. 17471) bonyolultabbnak tűnik. Lehetséges, hogy a heterozigóta törzsből a *CaPPZI-4* allél elveszett. De a legvalószínűbb az lehet, hogy beteg tüdeje egy külső *Candida* forrással fertőződött. Ezek az észrevételek összhangban vannak Jacobsen és mtsai (2008) azon megfigyeléseivel, miszerint egy beteg több genetikailag különböző *C. albicans* törzset is hordozhat. Ezek az eredmények együttesen megerősítik azt a tényt, hogy egy immunszuppresszált személy hajlamos arra, hogy saját kommenzalista kórokozója túlszaporodjon benne és fogékony legyen a külső forrásból származó gombás fertőzésre is.

A munkánk során felhívtuk a figyelmet arra, hogy a *CaPPZI* gén 3'-nemkódoló hipervariábilis régiója sokkal változatosabb a jelenleg genotipizálásra használatos géneknél, ami új lehetőséget ad a klinikai izolátumok genotipizálására és epidemiológiai következtetések levonására.

8. KONKLÚZIÓK

A *Drosophila* kalpain B foszforilációjának vizsgálata

1. A rekombináns kalpain B az aminosav szekvencián alapuló predikcióval összhangban *in vitro* foszforilálható PKA, ERK1 és ERK2 enzimekkel. *In vitro* körülmények között a PKA a Ser240 és Ser845; az ERK1/ERK2 enzimek a Thr747 oldalláncot foszforilálják.
2. A foszforiláció illetve a foszforilációt mimikáló irányított mutációk a kalpain B aktiválódását és aktivitását is növelik.
3. Az EGF-kezelés hatására aktiválódó ERK útvonal a kalpain B Thr747 oldalláncának foszforilációját és aktiválódását eredményezi *Drosophila* S2 sejteken. EGF-kezelés hatására a Ser240 is foszforilálódik, ami feltehetően nem a PKA, hanem a kalcium/kalmodulin függő protein kináz II működésével magyarázható.

Tehát igazoltuk, hogy egy Ca^{2+} -függő proteáz aktivitása foszforilációval szabályozható, ami alátámasztja a különböző jelpályák összekapcsolódását.

A *Candida albicans* protein foszfatáz Z1 gén polimorfizmusának vizsgálata

1. A *C. albicans*-ban egyetlen CaPPZ1-nek nevezett protein foszfatáz Z gén található, amely jelentős szekvencia polimorfizmust mutat. Kimutattuk a gén 3 új allélját és igazoltuk a gén 3'-nemkódoló régiójának nagyfokú variabilitását.
2. A CaPPZ1 gén hipervariábilis szakaszának vizsgálatára két különböző módszert dolgoztunk ki, amely alkalmas klinikai *C. albicans* izolátumok genotipizálására és epidemiológiai következtetések levonására.

Eredményeinkkel megerősítettük és kibővítettük a parazita gomba nagyfokú genetikai variabilitására vonatkozó ismereteket.

9. ÖSSZEFOGLALÁS

A sejtek intracelluláris jelátviteli folyamatainak szabályozása enzimszerek bonyolult kölcsönhatása révén valósul meg. Érdekes összefonódást lehet megfigyelni a proteolitikus és a protein kináz/foszfátáz rendszerek között. A kalpainok ugyanis irreverzibilis limitált proteolízis révén, míg a protein kinázok és foszfátázok reverzibilis foszforilációval szabályozzák célfehérjéiket, ezáltal új funkcionális állapotba hozva azokat.

Munkánk első felében megvizsgáltuk a *Drosophila melanogaster* kalpain B foszforilációját. Az előzetesen jóslott potenciális foszforilációs helyek jelenlétét *in vitro* kísérletekkel bizonyítottuk. Azt kaptuk, hogy a rekombináns kalpain B foszforilálható PKA, illetve ERK1 és ERK2 kinázokkal. Tömegspektrometriás módszerekkel azonosítottuk, hogy a PKA a Ser240 és a Ser845, az ERK1/2 enzimek pedig a Thr747 oldalláncot foszforilálják. Ezt követően három különböző módszerrel mértük a foszforiláció hatását az enzim működésére. Megállapítottuk, hogy a foszforiláció növelte a kalpain autoproteolitikus aktiválódását és aktivitását. A kináz kezelés az enzim Ca^{2+} -érzékenységét is fokozta. Foszforilációs hely mutánsokkal (Thr747Glu és Ser845Glu) elvégzett kísérleteink megerősítették a fenti eredményeinket. *In vivo* foszforilációs kísérletekkel igazoltuk a Thr747 foszforilációját EGF-fel stimulált *Drosophila* S2 sejteken. Eredményeink azt sugallják, hogy az extracelluláris jel hatására aktiválódó ERK útvonal az *ecetmuslica* kalpain B foszforilációját és aktiválódását eredményezi. Kimutattuk még, hogy EGF-kezelés hatására a Ser240 is foszforilálódik *in vivo*, amely azonban feltehetően nem a PKA, hanem a CaMKII működésével magyarázható. Eredményeink azt igazolják, hogy a kalpain B proteolitikus aktivitása foszforilációval/defoszforilációval szabályozható.

Munkánk második részében a *Candida albicans* jelátviteli folyamatában jelentős szerepet játszó protein foszfátáz Z gént tanulmányoztuk. Az irodalmi adatokkal és a DNS szekvencia adatbázisban lévő információkkal összhangban Southern blot kísérlettel igazoltuk, hogy a *C. albicans*-ban egyetlen PPZ gén található, amelyet CaPPZI-nek nevezünk el. Az ATCC 10231 tesztörzsből származó CaPPZI klónozása és szekvenálása után derült fény a gén polimorfizmusára, illetve a törzs heterozigóta természetére. Klinikai és referencia törzseken végzett vizsgálataink során a CaPPZI gén négy különböző allélját ismertük fel. A CaPPZI gén 3'-nemkódoló régiója különösen nagyfokú variabilitást mutatott. Kísérleteink során szekvenáltattuk ezt a génszakaszt és azt tapasztaltuk, hogy a 27 klinikai és referencia törzsből származó hipervariábilis régiók mindegyike besorolható volt a korábban azonosított allélok valamelyik csoportjába. A DNS szekvenálás eredményeit RFLP analízissel is alátámasztottuk. Összesen öt CaPPZI allélkombinációt mutattunk ki a különböző *C. albicans* törzsekben. További pontmutációkat is detektáltunk, amelyek növelik a patogén gomba genetikai sokféleségét. Eredményeink alapján a CaPPZI gén hipervariábilis régiója alkalmas lehet klinikai mintákból származó *C. albicans* izolátumok genotipizálására és a fertőzés eredetének felderítésére.

10. SUMMARY

The intracellular signaling pathways are regulated by complex networks of enzyme systems. There is a remarkable interplay between the proteolytic and the protein kinase/phosphatase systems. Calpains regulate their target proteins via irreversible limited proteolysis, while protein kinases and phosphatases alter proteins by reversible phosphorylation, turning them into various conformations and functional stages.

In the first part of our work we studied the phosphorylation of calpain B in *Drosophila melanogaster*. We confirmed the presence of the predicted hypothetical phosphorylation sites with *in vitro* experiments. We found that recombinant calpain B can be phosphorylated by PKA as well as by ERK1 and ERK2 kinases. Mass spectrometric analyses revealed that PKA phosphorylates Ser240 and Ser845, in addition, Thr747 was identified as the site of phosphorylation of either ERK1 or ERK2. We employed three independent methods to investigate the effects of phosphorylation on enzyme functions. We demonstrated that phosphorylation increased both of the autoproteolytic activation and the activity of calpain B. Moreover, the kinase treatment enhanced the Ca²⁺ sensitivity of the enzyme. Experiments with phosphorylation mimicking mutants (Thr747Glu and Ser845Glu) supported our previous conclusions. The *in vivo* phosphorylation of Thr747 was detected in EGF stimulated *Drosophila* S2 cells. Our results indicate that ERK signaling pathway activated by extracellular signals result in the phosphorylation and activation of fruit fly calpain B. We also demonstrated the *in vivo* phosphorylation of Ser240 that is presumably not caused by PKA, but by CaMKII. Collectively our data support the notion that the proteolytic activity of calpain B is regulated by protein phosphorylation/dephosphorylation.

In the second part of our work we investigated the gene of protein phosphatases Z, an important regulatory enzyme in *Candida albicans*. As the first step of the study we proved with Southern blot experiments that, in accordance with data in the literature. *C. albicans* has only one PPZ gene termed CaPPZ1. The cloning and sequencing of the CaPPZ1 of the ATCC 10231 reference strain revealed the polymorphism of the gene and the heterozygosity of the strain. By the analyses of the gene in clinical samples and reference strains we discovered the existence of four distinct CaPPZ1 alleles. Characteristic nucleotide replacements and insertions/deletions were detected at the coding and noncoding regions. The 3'-noncoding regions of the CaPPZ1 alleles showed an exceptionally high degree of variability. The sequencing of this area showed that the hypervariable regions from 27 clinical and reference strains fall into one of the previously identified four alleles. The DNA sequencing data were confirmed by RFLP analysis. Altogether we found no more than five CaPPZ1 allele combinations in different *C. albicans* strains. In addition, we detected individual point mutations, which elevated the genetic heterogeneity of this pathogenic yeast. According to our results, the hypervariable region of the CaPPZ1 gene may be suitable for genotyping *C. albicans* isolated from clinical samples. By comparing the haplotypes of the strains one can reveal the origin of the infection.

11. IRODALOMJEGYZÉK

Adachi Y, Kobayashi N, Murachi T, Hatanaka M. (1986). Ca^{2+} -dependent cysteine proteinase, calpains I and II are not phosphorylated *in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun* **13**, 1090-1096.

Alexa A, Schmidt G, Tompa P, Ogueta S, Vázquez J, Kulcsár P, Kovács J, Dombrádi V, Friedrich P (2002) The phosphorylation state of threonine-220, a uniquely phosphatase-sensitive protein kinase A site in microtubule-associated protein MAP2c, regulates microtubule binding and stability. *Biochemistry* **41**, 12427-12435.

Alexa A, Bozóky Z, Farkas A, Tompa P, Friedrich P (2004) Contribution of distinct structural elements to activation of calpain by Ca^{2+} ions. *J Biol Chem* **279**, 20118-20126.

Almo SC, Bonanno JB, Sauder JM, Emtage S, Diloranzo TP, Malashkevich V, Wasserman SR, Swaminathan S, Eswaramoorthy S, Agarwal R, Kumaran D, Madegowda M, Ragumani S, Patskovsky Y, Alvarado J, Ramagopal UA, Faber-Barata J, Chance MR, Sali A, Fiser A, Zhang ZY, Lawrence DS, Burley SK. (2007). Structural genomics of protein phosphatases. *J Struct Funct Genomics* **8**, 121-140.

Arino J (2002). Novel protein phosphatases in yeast. *Eur J Biochem* **269**, 1072-1077.

Baki A, Tompa P, Alexa A, Molnár O, Friedrich P (1996). Autolysis parallels activation of mu-calpain. *J Biochem* **318**, 897-901.

Balcells L, Gomez N, Casamayor A, Clotet J, Arino J (1997). Regulation of salt tolerance in fission yeast by a protein-phosphatase-Z-like Ser/Thr protein phosphatase. *Eur J Biochem* **250**, 476-483.

Balcells L, Calero F, Gomez N, Ramos J, Arino J (1999) The *Schizosaccharomyces pombe* Pzh1 protein phosphatase regulates sodium influx in a Trk1-independent fashion. *Eur J Biochem* **260**, 31-37.

Barford D, Jia Z, Tonks NK (1995). Protein tyrosine phosphatases take off. *Nature Struct Biol* **2**, 1043-1053.

Barford D, Hu SH, Johnson LN (1991) Structural mechanism for glycogen phosphorylase control by phosphorylation and AMP *J Mol Biol* **218**, 233-260.

Barrett AJ, Rawlings ND, O'Brien EA (2001) The MEROPS database as a protease information system. *J Struct Biol* **134**, 95-102.

Bougnoux ME, Morand S, d'Enfert C (2002). Usefulness of multilocus sequence typing for characterization of clinical isolates of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* **40**, 1290-1297.

Bougnoux, M. E., Tavanti, A., Bouchier, C., Gow, N. A. R., et al., 2003. Collaborative consensus for optimized multilocus sequence typing of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* **41**, 5265-5266.

- Bozóky Z, Alexa A, Tompa P, Friedrich P (2005). Multiple interactions of the 'transducer' govern its function in calpain activation by Ca²⁺. *J Biochem* **388**, 741-744.
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Brown N, Crawford C. (1993). Structural modifications associated with the change in Ca²⁺ sensitivity on activation of m-calpain. *FEBS Lett* **323**, 65-68.
- Chang C, Stewart RC (1998). The two-component system. Regulation of diverse signaling pathways in prokaryotes and eukaryotes. *Plant Physiol* **117**, 723-731.
- Clotet J, Posas F, de Nadal E, Arino J (1996). The NH₂-terminal extension of protein phosphatase PPZ1 has an essential functional role. *J Biol Chem* **271**, 26349-26355.
- Clotet J, Gari E, Aldea M, Arino J (1999). The yeast Ser/Thr phosphatases Sit4 and PPZ1 play opposite roles in regulation of the cell cycle. *Mol Cell Biol* **19**, 2408-2415.
- Cohen PTW (1997). Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life. *Trends Biochem Sci* **22**, 245-251.
- Cong JY, Goll DE, Peterson AM, Kapprell HP (1989). The role of autolysis in activity of the Ca²⁺-dependent proteinases (μ -calpain and m-calpain). *J Biol Chem* **264**, 10096-10103.
- Cong JY, Thompson VF, Goll DE (2000). Phosphorylation of the calpains (Abstract). *Mol Biol Cell* **11**; 386a.
- Cozzone AJ (1988). Protein phosphorylation in prokaryotes. *Annu Rev Microbio*. **42**, 97-125.
- Crawford C. (1990). Protein and peptide inhibitors of calpains. In: Intracellular Calcium-Dependent Proteolysis. Boca Raton, FL: CRC, pp. 75-89.
- Creighton T (1993) Proteins: Structure and molecular properties. Freeman. New York
- Dean AM, Koshland DE Jr (1990). Electrostatic and steric contribution to regulation at the active site of isocitrate dehydrogenase. *Science* **249**, 1044-1046.
- Delaney SJ, Hayward DC, Barleben F, Fischbach KF, Miklos GL (1991). Molecular cloning and analysis of small optic lobes, a structural brain gene of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 7214-7218.
- Dombrádi V, Krieglstein J, Klumpp S (2002). Regulating the regulators: Protein phosphorylation and protein phosphatases. *EMBO Reports* **3**, 120-124.
- Elce JS, Hegadorn C, AND Arthur JSC (1997). Autolysis, Ca²⁺-requirement, and heterodimer stability in m-calpain. *J Biol Chem* **272**, 11268-11275.
- Emori Y, Kawasaki H, Imajoh S, Minami Y, Suzuki K (1988). All four repeating domains of the endogenous inhibitor for calcium-dependent protease independently retain inhibitory activity. *J Biol Chem* **263**, 2364-2370.

- Farkas A, Tompa P, Schád É, Sinka R, Jékely G, Friedrich P (2004a). Autolytic activation and localization in Schneider cells (S2) of Calpain B from *Drosophila*. *J Biochem* **378**, 299-305.
- Farkas A, Nardai G, Csermely P, Tompa P, Friedrich P (2004b). DUK114, the *Drosophila* orthologue of bovine brain calpain activator protein, is a molecular chaperone. *J Biochem* **383**, 165-170.
- Fekete A, Pócsi I, Emri T, Gyetvai A, Gazdag Z, Pesti M, Karányi Z, Majoros L, Gergely L, Pócsi I (2008). Physiological and morphological characterization of tert-butylhydroperoxide tolerant *Candida albicans* mutants. *J Basic Microbiol* **48**, 480-4877.
- Friedrich P, Tompa P, Farkas A (2004). The calpain-system of *Drosophila melanogaster*: coming of age. *Bioessays* **26**, 1088-96.
- Friedrich P, Bozóky Z (2005). Digestive versus regulatory proteases: on calpain action *in vivo*. *Biol Chem* **386**, 609-612.
- Geesink GH, Nonneman D, Koohmaraie M (1998). An improved purification protocol for heart and skeletal muscle calpastatin reveals two isoforms resulting from alternative splicing. *Arch Biochem Biophys* **356**, 19-24.
- Glading A, Bodnar RJ, Reynolds IJ, Shihara H, Satish L, Potter DA, Blair HC, Wells A (2004). Epidermal growth factor activates m-calpain (calpain II), at least in part by extracellular signal-regulated kinase-mediated phosphorylation. *Mol Cell Biol* **24**, 2499-2512.
- Goldberg J, Huang HB, Kwon YG, Greengard P, Nairn AC, Kuriyan J (1995). Three-dimensional structure of the catalytic subunit of protein serine/threonine phosphatase-1. *Nature* **376**, 745-753.
- Goll DE, Thompson VF, Taylor RG, Edmunds T, Cong J. (1995). Properties and biological regulation of the calpain system. In: Expression of Tissue Proteinases and Regulation of Protein Degradation Degradation, edited by Ouali A, Demeyer DI, and Smulders F. Utrecht, The Netherlands, pp.47-68.
- Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W, Cong J (2003). The calpain system. *Physiol Rev* **83**, 731-801.
- Graham-Siegenthaler K, Gauthier S, Davies PL, Elce JS (1994). Active recombinant rat calpain II. Bacterially produced large and small subunits associate both *in vivo* and *in vitro*. *J Biol Chem* **269**, 30457-30460.
- Guroff G (1964). A neutral, calcium-activated proteinase from the soluble fraction of rat brain. *J Biol Chem* **239**, 149-155.
- Hanaoka N, Takano Y, Shibuya K, Fugo H, Uehara Y, Niimi M (2008). Identification of the putative protein phosphatase gene *PTCI* as a virulence-related gene using a silkworm model of *Candida albicans* infection. *Eukaryot Cell* **7**, 1640-1648.

Hao, L.Y., Kameyama, A., Kuroki, S., Takano, J., Takano, E., Maki, M., and Kameyama, M. (2000). Calpastatin domain L is involved in the regulation of L-type Ca²⁺ channels in guinea pig cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **279**, 756-761.

Hlavanda E, Klement E, Kókai E, Kovács J, Vincze O, Tökési N, Orosz F, Medzihradszky KF, Dombrádi V, Ovádi J (2007) Phosphorylation blocks the activity of tubulin polymerization-promoting protein (TPPP): identification of sites targeted by different kinases. *J Biol Chem* **282**, 29531-29539.

Hughes V, Muller A, Stark MJ, Cohen PTW (1993). Both isoforms of protein phosphatase Z are essential for the maintenance of cell size and integrity in *Saccharomyces cerevisiae* response to osmotic stress. *Eur J Biochem* **216**, 269-279.

Hunter T (1995). Protein kinases and phosphatases: The Yin and Yang of protein phosphorylation and signalling. *Cell* **80**, 225-236.

Imajoh S, Kawasaki H, Suzuki K (1986). The amino-terminal hydrophobic region of the small subunit of calcium-activated neutral protease (CANP) is essential for its activation by phosphatidylinositol. *J Biochem* **99**, 1281–1284.

Ingebritsen TS, Cohen PTW (1983). Protein phosphatases: properties and role in cellular regulation. *Science* **221**, 331-338.

Inoue H, Nojima H, Okayama H (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**, 23-28.

Jackson MD, Denu JM (2001). Molecular reaction of protein phosphatases - insights from structure and chemistry. *Chem Rev* **101**, 2313-2340.

Jacobsen MD, Duncan AD, Bain J, Johnson EM, Naglik JR, Shaw DJ, Gow NA, Odds FC (2008). Mixed *Candida albicans* strain populations in colonized and infected mucosal tissues. *FEMS Yeast Res* **8**, 1334–1338.

Jékely G, Friedrich P (1999). Characterization of two recombinant *Drosophila* calpains, CALPA and a novel homolog, CALPB. *J Biol Chem* **274**, 23893-23900.

Johnson DA, Lewis RJ. (2001). Structural basis for control by phosphorylation. *Chem Rev* **101**, 2209-2242.

Jones T, Federspiel NA, Chibana H, Dungan J, Kalman S, Magee BB, Newport G, Thorstenson YR, Agabian N, Magee PT, Davis RW, Scherer S (2004). The diploid genome sequence of *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **19**, 7329-7334.

Kamei M, Webb GC, Heydon K, Hendry IA, Young IG, Campbell HD (2000). Solh, the mouse homologue of the *Drosophila melanogaster*'s optic lobes gene: organization, chromosomal mapping, and localization of gene product to the olfactory bulb. *Genomics* **64**, 82-89.

Kawasaki H, Emori Y, AND Suzuki K. (1993). Calpastatin has two distinct sites for interaction with calpain - effect of calpastatin fragments on the binding of calpain to membranes. *Arch Biochem Biophys* **305**, 467–472.

Kiss A, Lontay B, Bécsi B, Márkász L, Oláh É, Gergely P, Erdódi F (2008) Myosin phosphatase interacts with and dephosphorylates the retinoblastoma protein in THP-1 leukemic cells: its inhibition is involved in the attenuation of daunorubicin-induced cell death by calyculin-A. *Cell Signal* **20**, 2059-70.

Kovács L, Alexa A, Klement E, Kókai E, Tantos A, Gógl G, Sperka T, Medzihradzky KF, Tózsér J, Dombrádi V, Friedrich P (2009). Regulation of calpain B from *Drosophila melanogaster* by phosphorylation. *FEBS J* **276**, 4959-4972.

Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

Larriba G, Calderone, RA (2008). Heterozygosity and loss of heterozygosity in *Candida albicans*. In: San-Blas, G., Calderon, R.A. (Ed.), Pathogenic fungi - Insights in molecular biology. Caister Academic Press, Wymondham, UK, pp. 43-76.

LaVoie MJ, Selkoe DJ (2003) The Notch ligands, Jagged and Delta, are sequentially processed by alpha-secretase and presenilin/gamma-secretase and release signaling fragments. *J Biol Chem* **278**, 34427-37.

Lee KS, Hines LK, Levin DE (1993). A pair of functionally redundant yeast genes (PPZ1 and PPZ2) encoding type 1-related protein phosphatases function within the PKC1-mediated pathway. *Mol Cell Biol* **13**, 5843-5853.

Lee SB, Milgroom MG, Taylor JW (1988). A rapid, high yield mini-prep method for isolation of total genomic DNA from fungi. *Fungal Genet Newsl* **35**, 23.

Lee WJ, Hatanaka M, Maki M. (1992a). Multiple forms of rat calpastatin cDNA in the coding region of functionally unknown amino terminal domain. *Biochim Biophys Acta* **1129**, 251-253.

Lee WJ, Ma H, Takano E, Yang HQ, Hatanaka M, Maki M. (1992b). Molecular diversity in amino-terminal domains of human calpastatin by exon skipping. *J Biol Chem* **267**: 8437-8442.

MacCallum DM, Castillo L, Nather K, Munro CA, Brown AJ, Gow NA, Odds FC (2009). Property differences among the four major *Candida albicans* strain clades. *Eukaryotic Cell* **8**, 373-387.

Maki M, Narayana S, Hitomi K (1997). A growing family of the Ca²⁺- binding proteins with five EF-hand motifs. *J Biochem* **328**, 718–720.

Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science* **298**, 1912-1934.

- McClelland P, Lash JA, Hathaway DR. (1989). Identification of major autolytic cleavage sites in the regulatory subunit of vascular calpain II. A comparison of partial amino-terminal sequences to deduced sequence from complementary DNA. *J Biol Chem* **264**, 17428-17431.
- Moldoveanu T, Hosfield CM, Lim D, Elce JS, Jia Z, Davies PL (2002). A Ca²⁺ switch aligns the active site of calpain. *Cell* **108**, 649-660.
- Molloy SS, Anderson ED, Jean F, Thomas G (1999). Bi-cycling the furin pathway: From TGN localization to pathogen activation and embryogenesis. *Trends Cell Biol* **9**, 28-35.
- Moolenaar WH, Aerts RJ, Tertoolen LG, de Laat SW (1986) The epidermal growth factor-induced calcium signal in A431 cells. *J Biol Chem* **261**, 279-284.
- Murachi T (1989). Intracellular regulatory system involving calpain and calpastatin. *Biochem Int* **18**, 263-294.
- Nadal DE, Clotet J, Posas F, Serrano R, Gómez N, Arino J (1998). The yeast halotolerance determinant Hal3p is an inhibitory subunit of the PPZ1p Ser/Thr protein phosphatase. *Biochem* **95**, 7357-7362.
- Nadal DE, Faddent RP, Ruiz A, Haystead, Arino J (2001). A role for the PPZ Ser/Thr protein phosphatases in the regulation of translation elongation factor 1B α . *J Biol Chem* **276**, 14829-14834.
- Odds FC, Davidson AD, Jacobsen MD, Tavanti A, Whyte JA, Kibbler CC, Ellis DH, Maiden MC, Shaw DJ, Gow NA (2006). *Candida albicans* strain maintenance, replacement, and microvariation demonstrated by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol* **44**, 3647-3658.
- Odds FC, Jacobsen MD (2008). Multilocus sequence typing of pathogenic *Candida* species. *Eukaryotic Cell* **7**, 1075-1084.
- Ohno S, Emori Y, Imajoh S, Kawasaki H, Kisaragi M, Suzuki K (1984). Evolutionary origin of a calcium-dependent protease by fusion of genes for a thiol protease and a calcium-binding protein? *Nature* **312**, 566-570.
- Okitani A, Goll DE, Stromer MH, Robson RM (1976). Intracellular inhibitor of a Ca²⁺-activated protease involved in myofibrillar protein turnover. *Federation Proc* **35**, 1746.
- Otsuka Y, Goll DE. (1987). Purification of the Ca²⁺-dependent proteinase inhibitor from bovine cardiac muscle and its interaction with the millimolar Ca²⁺-dependent proteinase. *J Biol Chem* **262**, 5839-5851.
- Paetzel M, Karla A, Strynadka NCJ, Dalbey RE, (2002). Signal peptidases. *Chem Rev* **102**, 4549-4579.
- Page M, Thorpe R (2002). Purification of IgG by precipitation with sodium sulfate or ammonium sulfate. In: Walker JM (Ed.), *The Protein Protocols Handbook*. Humana Press Totowa, NJ, pp. 983–984.

- Pintér M, Friedrich P (1988). The calcium dependent proteolytic system calpain-calpastatin in *Drosophila melanogaster*. *J Biochem* **253**, 467-473.
- Pintér M, Stierandova A, Friedrich P (1992) Purification and characterization of a Ca^{2+} -activated thiol protease from *Drosophila melanogaster*. *Biochemistry* **31**, 8201-8206.
- Posas F, Casamayor A, Morral N, Arino J (1992). Molecular cloning and analysis of a yeast protein phosphatase with an unusual amino-terminal region. *J Biol Chem* **267**, 11734-11740.
- Posas F, Casamayor A, Arino J (1993). The PPZ protein phosphatase are involved in the maintenance of osmotic stability of yeast cells. *FEBS Lett* **318**, 282-286.
- Posas F, Bollen M, Stalmans W, Arino J (1995a). Biochemical characterization of recombinant yeast PPZ1, a protein phosphatase involved in salt tolerance. *FEBS Lett* **368**, 39-44.
- Posas F, Camps M, Arino J (1995b). The PPZ protein phosphatases are important determinants of salt tolerance in yeast cells. *J Biol Chem* **270**, 13036-13041.
- Puente XS, Sánchez LM, Overall CM, López-Otín C. (2003). Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nat Rev Genet* **4**, 544-58.
- Rawlings ND, Morton FR, AJ Barrett AJ (2005). MEROPS: the peptidase database. <http://merops.sanger.ac.uk/>
- Reverter D, Sorimachi H, Bode W (2001) The structure of calcium-free human m calpain. Implications for calcium activation and function. *Trends Cardiovasc Med* **11**, 222-229.
- Rizo J, Südhoff TC (1998). C2-domains, structure and function of a universal Ca^{2+} binding domain. *J Biol Chem* **273**, 15879–15882.
- Rockwell NC, Krysan DJ, Komiyama T, Fuller RS (2002). Precursor processing by kex2/furin proteases. *Chem Rev* **102**, 4525-4548.
- Ruiz A, Ruiz DCM, Sánchez-Garrido MA, Arino J, Ramos J (2004). The Ppz protein phosphatases regulate Trk-independent potassium influx in yeast. *FEBS Lett* **578**, 58–62.
- Schád É, Farkas A, Jékely G, Tompa P, Friedrich P (2002). A novel human small subunit of calpains. *J Biochem* **362**, 383-388.
- Sealey PG, Southern EM (1990). Gel electrophoresis of DNA. In Rickwood, D., Hames, B.D. (Ed.), *Gel electrophoresis of nucleic acids - A practical approach*. IRL Press, Oxford, New York, Tokyo, pp. 51-99.
- Shao H, Chou J, Baty CJ, Burke NA, Watkins SC, Stolz DB, Wells A (2006). Spatial localization of m-calpain to the plasma membrane by phosphoinositide biphosphate binding during epidermal growth factor receptor-mediated activation. *Mol and Cell Biol* **26**, 5481-5496.

- Shihara H, Glading A, Chou J, Jia Z, Wells A (2002) Activation of m-calpain (calpain II) by epidermal growth factor is limited by protein kinase A phosphorylation of m-calpain. *Mol Cell Biol* **22**, 2716-2727.
- Smith SD, Jia Z, Huynh KK, Wells A, Elce JS (2003). Glutamate substitutions at a PKA consensus site are consistent with inactivation of calpain by phosphorylation. *FEBS* **542**, 115-118.
- Spadoni C, Farkas A, Sinka R, Tompa P, Friedrich P (2003). Molecular cloning and RNA expression of a novel *Drosophila* calpain, Calpain C. *Biochem Biophys Res Commun* **303**, 343-349.
- Suzuki K, Tsuji S, Kubota S, Kimura Y, Imahori K (1981). Limited autolysis of Ca²⁺-activated neutral protease (CANP) changes its sensitivity to Ca²⁺ ions. *J Biochem* **90**, 275-278.
- Suzuki K (1990). The structure of the calpains and the calpain gene. In: Mellgren RL and Murachi T (Ed.), *Intracellular Calcium-Dependent Proteolysis*. Boca Raton, FL: CRC, pp. 25–35.
- Szabó Z, Tóth B, Kovács M, Kardos G, Maráz A, Rozgonyi F, Majoros L (2008). Evaluation of the new Micronaut-Candida system compared to the API ID32C method for yeast identification. *J Clin Microbiol* **46**, 1824-1825.
- Szöör B, Fehér Zs, Zeke T, Gergely P, Yatzkan E, Yarden O, Dombrádi V (1998). pzl-1 encodes a novel protein phosphatase-Z-like Ser/Thr protein phosphatase in *Neurospora crassa*. *Biochim Biophys Acta, Protein Structure and Molecular Enzymology* **1388**, 260-266.
- Takano E, Maki M, Mori H, Hatanaka M, Marti T, Titani K, Kannagi R, Ooi T, Murachi T (1988). Pig heart calpastatin: identification of repetitive domain structures and anomalous behavior in polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochemistry* **27**, 1964-1972.
- Takano E, Ma H, Yang HQ, Maki M, Hatanaka M. (1995). Preference of calcium-dependent interactions between calmodulin-like domains of calpain and calpastatin subdomains. *FEBS Lett* **362**, 93-97.
- Theopold U, Pintér M, Daffre S, Tryselius Y, Friedrich P, Naessel DR, Hultmark D. (1995). Calp A, a *Drosophila* calpain homology specifically expressed in a small set of nerve, midgut, and blood cells. *Mol Cell Biol* **15**, 824-834.
- Tompa P, Emori Y, Sorimachi H, Suzuki K, Friedrich P (2001). Domain III of calpain is a Ca²⁺-regulated phospholipid-binding domain. *Biochem Biophys Res Commun* **280**, 1333-1339.
- Tompa P (2002). Intrinsically unstructured proteins. *Trends Biochem Sci* **27**, 527-533.
- Vissi E, Clotet J, Nadal DE, Barcelo A, Bakó E, Gergely P, Dombrádi V, Arino J (2001) Functional analysis of the *Neurospora crassa* PZL-1 protein phosphatase by expression in budding and fission yeast. *Yeast* **18**, 115-124.

Walsh CT (2005). *Postranslational Modification of Proteins: Expanding Nature's Inventory*, Roberts & Company Publishers, Colorado, USA, pp. 1-242.

Witt JJ, Roskoski R Jr (1975). Rapid protein kinase assay using phosphocellulose-paper absorption. *Anal Biochem* **66**, 253-258.

Xie X, Dwyer MD, Swenson L, Parker MH, Botfield MC (2001). Crystal structure of calcium-free human sorcin: a member of the penta-EFhand protein family. *Protein Sci* **10**, 2419–2425.

Xu D, Jiang B, Ketela T, Lemieux S, Veillette K, Martel N, Davison J, Sillaots S, Trosok S, Bachewich C, Bussey H, Youngman P, Roemer T (2007) Genome-Wide Fitness Test and Mechanism-of-Action Studies of Inhibitory Compounds in *Candida albicans*. *PLoS Pathog* **3**, e92.

Xu L, Deng X (2006). Protein kinase C α promotes nicotine-induced migration and invasion of cancer cells via phosphorylation of μ - and m-calpain. *J Biol Chem* **281**, 4457-4466.

Yenush L, Mulet J M, Arino J, Serrano R (2002). The PPZ protein phosphatases are key regulators of K⁺ and pH homeostasis: implications for salt tolerance, cell wall integrity and cell cycle progression. *EMBO J* **21**, 920-929.

Zimmerman UJP, Schlaepfer WW (1991). Two stage autolysis of the catalytic subunit initiates activation of calpain I. *Biochim Biophys Acta* **1078**, 192-198.

12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani Dr. Dombrádi Viktor egyetemi tanárnak, témavezetőmnek, hogy számos elméleti és gyakorlati tanáccsal segítette és irányította munkámat.

Köszönöm Dr. Gergely Pál egyetemi tanárnak, hogy munkámat támogatta és lehetővé tette számomra, hogy a DEOEC Orvosi Vegytani Intézetében dolgozzak.

Szeretném megköszönni az Orvosi Vegytani Intézet minden dolgozójának a munkámhoz nyújtott segítséget. Külön köszönet Dr. Farkas Ilonának, Dr. Kókai Endrének, Ádám Csabának és Kása Anitának a kísérletes munka során nyújtott segítségükért. Továbbá szeretném megköszönni Dr. Csontos Csilla, Dr. Erdélyi Katalin, Dr. Kakukk Annamária, Dr. Kiss Andrea, Dr. Lontay Beáta, Brunyánszki Attila és Czikora István szakmai és gyakorlati tanácsait. Hálás köszönettel tartozok Bíró Istvánné, Kelemenné Szántó Ágota és Tankáné Farkas Andrea asszisztenseknek a laboratóriumi munkában nyújtott segítségükért.

Köszönet Dr. Alexa Anitának a kalpain B aktivitás mérésekben nyújtott segítségével és hogy biztosította számunkra a rekombináns fehérjét; Dr. Joaquin Arino-nak a *S. cerevisiae* PPZI cDNS-t tartalmazó plazmidért, Dr. Erdei Annának a kalpain B elleni szérumért, Dr. Majoros Lászlónak a klinikai mintákért és a *Candida* törzsek azonosításáért, valamint Pócsi Imrének a gomba törzsek tenyésztésében nyújtott segítségével.

Köszönöm Dr. Tózsér Józsefnek, hogy engedélyezte a „*Proteolitikus enzimek osztályozása*” című ábra használatát.

Köszönetet szeretnék mondani Dr. Klement Évának az MS ábrák, Dr. Bagossi Péternek és Dr. Bozóky Zoltánnak a homológ modellek elkészítéséért.

Köszönet Dr. Panyi Györgynek, Dr. Nagy Péternek és Dr. Szöllősi Jánosnak, hogy lehetőséget és helyet biztosítottak számunkra a különálló gombasejtek izolálásához és a fluorimetriás mérésekhez.

Köszönöm Dr. Takács Gábornak az enzimkinetikai adatok matematikai modellezését.

Szeretném megköszönni barátnőmnek, Kása Anitának, hogy mindvégig türelmesen segítette munkámat.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm családomnak, hogy nyugodt és stabil háttérrel biztosítottak számomra.

13. PUBLIKÁCIÓS LISTA

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

László Kovács*, Anita Alexa*, Eva Klement, Endre Kókai, Ágnes Tantos, Gergő Gógl, Tamás Sperka, Katalin F. Medzihradzky, József Tőzsér, Viktor Dombrádi and Péter Friedrich (2009). Regulation of Calpain B from *Drosophila melanogaster* by Phosphorylation. *FEBS J* 276 (17):4959-72.

* megosztott első szerzők

IF: 3.139

László Kovács, Ilona Farkas, László Majoros, Márton Miskei, István Pócsi, Viktor Dombrádi (2010) The polymorphism of protein phosphatase Z1 gene in *Candida albicans*. *Journal of Basic Microbiology. J Basic Microbiol* Published Online: 14 May 2010

IF: 1.319

Az értekezéshez kapcsolódó előadások

Kovács L, Ádám Cs, Berényi E, Horváth A, Majoros L, Aradi J, Dombrádi V (2006). 4-Tiodezoxiuridin *Candida*-ellenes hatása. *MTA Antibiotikum Munkabizottság és MTA Nukleotidkémia Munkabizottság Tudományos Ülése*, Debrecen

Alexa A, Kovács L, Sperka T, Tőzsér J, Dombrádi V, Friedrich P (2007). A foszforiláció növeli a *Drosophila* kalpain B aktivitását. *A Magyar Proteomikai Társaság 2007. évi Vándorgyűlése*, Debrecen

Az értekezéshez kapcsolódó poszterek

Molnár G, Kovács L, Dombrádi V (2004). A PPZ protein foszfatázt kódoló gén kimutatása *Candida albicans*-ban. *Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztálya, 9. munkaértekezlete*, Sopron

Kovács L, Molnár G, Dombrádi V (2004). PPZ protein foszfatáz vizsgálat *Candida albicans*-ban. *XII. Sejt-és fejlődésbiológiai napok*, Pécs

Ádám Cs, Molnár G, Kovács L, Majoros L, Farkas I, Dombrádi V (2005). A *PPZI* *Candida albicans* protein foszfatáz gén jellemzése. *VI. Magyar Genetikai Kongresszus, XIII. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok*, Eger

Farkas I, Ádám Cs, Molnár G, Kovács L, Majoros L, Aradi J, Dombrádi V (2005). Molecular characterization of the *PPZI* gene from *Candida albicans*. *30th FEBS Congress and 9th IUBMB Meeting*, Budapest

Kovács L, Alexa A, Sperka T, Tózsér J, Dombrádi V, Friedrich P (2007). A *Drosophila* kalpain B működése foszforilációval regulálható. *Magyar Biokémiai Egyesület 2007. évi vándorgyűlése*, Debrecen

Kovács L, Alexa A, Kókai E, Gógl G, Klement É, Medzihradzky FK, Sperka T, Tózsér J, Dombrádi V, Friedrich P (2008). A *Drosophila melanogaster* kalpain B *in vitro* foszforilációja. *38. Membrán-Transzport Konferencia*, Sümeg

Kovács L, Ádám Cs, Farkas I, Pócsi I, Dombrádi V (2008). A *Candida albicans* protein foszfatáz Z molekuláris biológiai jellemzése. *Magyar Biokémiai Egyesület 2008. évi vándorgyűlése*, Szeged

Kovács L, Fekete A, Majoros L, Pócsi I, Dombrádi V (2009). A *Candida albicans* protein foszfatáz Z1 gén polimorfizmusának vizsgálata. *VIII. Magyar Genetikai Kongresszus, XV. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok*, Nyíregyháza

Kovács L, Fekete A, Majoros L, Pócsi I, Dombrádi V (2009). A *Candida albicans* protein foszfatáz Z1 gén (*CaPPZ1*) polimorfizmusa. 39. *Membrán-Transzport Konferencia*, Sümeg

Kovács L, Fekete A, Majoros L, Pócsi I, Dombrádi V (2009). The polymorphism of the *Candida albicans* protein phosphatase Z1 gene. *Europhosphatases*, Egmond, Hollandia

Kovács L, Alexa A, Klement É, Kókai E, Tantos Á, Gógl G, Sperka T, Medzihradzky FK, Tózsér J, Dombrádi V, Friedrich P (2009). *Drosophila*-ban az extracelluláris szignál-regulált kináz szabályozza a kalpain B-t. *Magyar Biokémiai Egyesület 2009. évi vándorgyűlése*, Budapest

Kovács L, Farkas I, Majoros L, Miskei M, Pócsi I, Dombrádi V (2010). A *CaPPZ1* gén polimorfizmusa. *Magyar Biokémiai Egyesület 2010. évi vándorgyűlése*, Budapest