

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**A KALPAIN ÉS A PROTEIN KINÁZ/FOSZFATÁZ
RENDSZEREK VIZSGÁLATA**

Kölcsönhatás a poszt szintetikus fehérje módosító rendszerek között

Kovács László



DEBRECENI EGYETEM
Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2010

Témavezető

Dr. Dombrádi Viktor, az MTA doktora

Doktori Iskola

Molekuláris Orvostudomány

Doktori Program

Jelátviteli folyamatok sejt- és molekuláris biológiája

A szigorlati bizottság tagjai**A bizottság elnöke:**

Dr. Szöllősi János, az MTA doktora

Bizottsági tagok:

Dr. Buday László, az MTA doktora

Dr. Szatmári István, Ph.D.

A védési bizottság tagjai:**A bizottság elnöke:**

Dr. Szöllősi János, az MTA doktora

Bizottsági tagok:

Dr. Deák Péter, Ph.D.

Dr. Biró Sándor, Ph.D.

A védés helye és ideje:

Debreceni Egyetem OEC, Orvosi- és Egészségtudományi Centrum,

I. Belgyógyászati Klinika tanterme

2010. október 22. 13 óra

1. Bevezetés

1.1 Fehérjék poszttranszlációs módosítása

A poszttranszlációs fehérje módosítások (PTM) során megváltoznak a fehérjékben lévő aminosav oldalláncok kémiai tulajdonságai. Ezek a változások a DNS-ben tárolt genetikai információ RNS-re, majd fehérjére történő átíródása után jönnek létre és hozzájárulnak a fehérjék szerkezetének és funkciójának sokféleségéhez. A legtöbb fehérje kémiai változásokon megy keresztül a szintézisét követően, mielőtt elnyeri végleges funkcióját. A PTM növeli a fehérje formák számát ill. szabályozza a fehérjék funkcióját azáltal, hogy módosítja aktivitásukat és sejten belüli elhelyezkedésüket. A PTM-ok két nagy csoportba sorolhatóak. 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 funkciós csoport lehet például az alkil-, foszfát- ill. glikozilcsoport, de nagyobb egységek (lipidek, szénhidrátok) és más prosztetikus csoportok is kötődhetnek a fehérjékhez. A fehérjeszintézis után bekövetkező kovalens szabályozás másik nagy csoportjába sorolhatóak azok a mechanizmusok, amelyek során a fehérjék peptidkötéseinek irreverzibilis hidrolitikus hasítása következik be.

1.2 Fehérjék foszforilációja és defoszforilációja

A fehérjék reverzibilis foszforilációja az egyik leggyakoribb PTM, amely mind a prokarióta, mind az eukarióta szervezetekben előfordul. A foszforilációs reakciót a protein kinázok katalizálják úgy, hogy az ATP, ritkábban a GTP gamma-foszfátcsoportját 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 ill. a Thr aminosav maradékokhoz kapcsolódik és csupán kis része kötődik a Tyr oldalláncokhoz. A foszforiláció során az elektrosztatikus kölcsönhatások átrendeződése következtében megváltozhat a fehérjék konformációja, amelyből kifolyólag a funkciójuk is módosulhat. A fehérjék reverzibilis foszforilációja szerepet játszik a sejtek energia metabolismusának, osztódásának, növekedésének és differenciálódásának, mozgásának, valamint anyagcsere folyamatainak szabályozásában. Ez a PTM csak akkor képes hatékony regulációs szerepet betölteni, amennyiben lehetőség nyílik a protein kinázok által beépített foszfátcsoport lehasítására, tehát ha a folyamat megfordítható. A foszfátcsoport hidrolitikus eltávolítását specifikus protein

foszfatázok katalizálják. A szabályozást a protein kinázok és protein foszfatázok működésének összhangja teremti meg. Nem meglepő tehát, hogy a szubsztrátfehérjék foszforiláltsági fokát ezen két nagy enzimesoport aktivitása és az egymáshoz való viszonya határozza meg.

1.2.1 A protein foszfatázok csoportosítása

A protein kinázok népes csoportot alkotnak, melynek minden tagja ugyanazon enzimesaládba sorolható. Ezzel szemben a protein foszfatázok száma jóval kevesebb, mégis több csoportba oszthatóak konvergens evolúciójuk következményeképpen. A foszfatázok szubsztrát specificitásuk, reakciómechanizmusuk és szerkezetük alapján osztályozhatóak. Egy részük a fehérjék Ser és Thr oldalláncát defoszforilálja, míg mások a fehérjék Tyr oldalláncára specifikusak. Ezek mellett léteznek ún. kettős specificitású foszfatázok (DSP), amelyek a fehérjék Ser/Thr és Tyr oldalláncairól egyaránt képesek a foszfátot lehasítani. A Ser/Thr specifikus foszfatázok további alsaládokra 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). A PPP és PPM kategóriába tartozó enzimek közös jellemzője, hogy aktív centrumukban két fémiont tartalmaznak, amelyek elősegítik a fehérjék Ser vagy Thr oldalláncához kapcsolódó foszfátcsoportok hidrolizisét. A PPP alsaláddhoz tartoznak a PP1, PP2A és a PP2B enzimek, melyek elkülönítése eredetileg szubsztrát specificitásuk és hőstabil gátló fehérjékkel szembeni érzékenységük alapján történt. Ide sorolhatóak még az új típusú protein foszfatázok is, amelyek szerkezetük alapján átmenetet mutatnak az előbb említett három csoport között.

1.2.2 A protein foszfatáz Z (PPZ) jellemzése

Az új típusú enzimek között két olyan foszfatázt sikerült azonosítani, mely csak gombákban fordul elő (PPZ és PPG). Ismert, hogy PPZ fehérjét *S. cerevisiae*-ben a *PPZ1* és *PPZ2*, a *S. pombe*-ben a *pzh1*, *N. crassa*-ban a *pzl-1*, míg a *C. albicans*-ban a *CaPPZ1* gén kódolja. A fehérjék három jól elkülönülő részre bonthatóak. Az enzim aktivitásáért felelős C-terminális katalitikus domén ill. a fehérjék N-terminális végén elhelyezkedő, kb. 50 aminosavból álló peptidszakasz, amely a fehérje mirisztilálásához és membránhoz való kötődéséhez szükséges nagyfokú azonosságot mutat mindegyik fehérjében. Mivel a katalitikus domén a PP1 katalitikus alegységéhez is hasonlít, így a PPZ enzimeket az 1. típusú Ser/Thr foszfatázok közé sorolták. Az N-terminális domén többi része és a két domént

összekötő szakasz viszont nagyon változatos. Az eredendően rendezetlen szerkezetű N-terminális régió regulációs szereppel rendelkezik. A *S. cerevisiae* PPZ protein foszfatázok részletes jellemzése már megtörtént. Tudjuk, hogy ozmotikus stressz körülmények között a PPZ fontos szerepet játszik a gombasejtek ozmotikus stabilitásának, sejtméretének és integritásának fenntartásában. A sejtfaleszintézis, ez által a sejtintegritás fenntartásának érdekében a PPZ kölcsönhat a PKC által aktivált mitogén aktivált protein kináz (MAPK) útvonallal. A legújabb eredmények azt bizonyítják, hogy a PPZ a Trk1/2 K⁺ transzport szabályozása révén fejt ki hatását. A *S. cerevisiae* PPZ protein foszfatázokhoz hasonló *C. albicans* PPZ1 funkciója eddig még nem ismert, csak annyit tudunk, hogy a diploid organizmusban a gén egyik vagy mindkét alléljának kiütése nem okoz letalitást. Munkánk során a *C. albicans* protein foszfatáz Z1 gént szerettük volna tanulmányozni.

1.3 Fehérjék limitált proteolízise

A fehérjék posztranszlációs kovalens módosításának másik nagy csoportjába tartozik a fehérjék irreverzibilis proteolízise. A folyamatot proteázok katalizálják. 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. Mivel a proteázok működése irreverzibilis folyamat, aktivitásuk szigorú szabályozás alatt áll. Limitált proteolízis kategóriájába sorolható 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, ugyanis Ca²⁺-jel hatására önmagukat hasítják a fehérjék N-terminális részén és ezáltal aktívvá válnak.

1.3.1 A kalpainok jellemzése

A kalpain Ca²⁺-aktivált neutrális, citoplazmatikus cisztein proteáz, amely szubsztrátfehérjéin limitált proteolízist hajt végre. A kalpainok számos fajban előfordulnak. Emlősökben 16, a *Drosophila*-ban 4 kalpain gén található. 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, ahol a nagy és a kis alegység dimert képez, a legtöbb kalpain azonban csak egy nagy alegységből áll. Az emlős kalpainok legjobban jellemzett tagjai a μ - és a m-

kalpainok. Nevüket az aktiválódásukhoz szükséges mikromólos ill. millimólos $[Ca^{2+}]$ alapján kapták. Heterodimer szerkezetűek, egy nagy 80 kDa és egy kis 30 kDa nagyságú alegységből állnak. Ezen emlősökben létfontosságú proteázok pontos szabályozása nem ismert, ugyanis az aktiválódásukhoz szükséges, fiziológiásnak nem mondható mikro- és millimoláris $[Ca^{2+}]$ azt sugallja, hogy egyéb tényezők is közrejátszanak a kalpainok aktiválásában. Ismert, hogy a foszforiláció, mint poszttranszlációs esemény vagy szabályozó anyagok, mint például a foszfolipidek módosíthatják a kalpain aktivitását illetve Ca^{2+} érzékenységet. Ezek mellett a kalpasztatin, mint gátló fehérje és az autolízis is befolyásolja az aktivitást. A kalpain rendszer fiziológiai funkciója még nem teljesen körülírt normál sejtekben, ennek ellenére tudjuk, hogy fontos szerepet játszik a jelátvitelben, a citoszkeleton szerkezetének szabályozásában, a sejtciklusban, az apoptózisban és a sejtmozgásban. Számos patológiás folyamat ismert, amelyek a kalpainok genetikai rendellenességére vagy a megváltozott Ca^{2+} -homeosztázis következtében létrejövő kalpain aktivitás változásra vezethetők vissza. A kalpainok részt vehetnek a gyomorrák, 2-es típusú diabetes, az Alzheimer-kór, a katarakta, az izomdisztrófia, a sclerosis multiplex és a stroke kialakulásában.

1.3.2 A kalpain B jellemzése

A *Drosophila melanogaster* genomjában négy kalpain gén található (A, B, C és D), amelyek közül a kalpain A és B aktív proteáz kódol, míg a kalpain C és D gén termékei proteolitikusan inaktív enzimek. A *Drosophila* kalpainok nagyfokú hasonlóságot mutatnak az emlős m-kalpain nagy, 80 kDa méretű alegységéhez. Közös jellemzőjük, hogy egyetlen polipeptid láncból állnak. Kis alegységet nem tartalmaznak. A kalpain B egy 104 kDa nagyságú fehérje. Jellemző rá, hogy egy nagyon hosszú, 224 aminosavból álló N-terminális I. domént hordoz. Ez egy Ca^{2+} -függő proteáz, a félmaximális aktiválásához szükséges $[Ca^{2+}]$ a millimoláris tartományba esik. Aktiválódása során az N-terminális vége Ca^{2+} -függő módon lehasad az autoproteolitikus reakció során. A Ca^{2+} -kötődésről megállapították, hogy olyan konformáció változás sorozatot indít meg a IV., kalmodulin-szerű domén felől a III. domén savas régiója irányába, amely végül a katalitikus domén IIa és IIb részének záródásához és a fehérje aktiválásához vezet. A kalpain B aktiválásához tehát elengedhetetlenül fontos a citoplazma $[Ca^{2+}]$ növekedése. Azonban *in vitro* körülmények között a félmaximális aktiválásához szükséges $[Ca^{2+}]$ messze van a fiziológiás tartománytól. A foszfolipidekről (PIP2, PIP, PI) kimutatták, hogy mind az aktiválás sebességét, mind a maximális aktivitást kis mértékben megnövelték. Ugyanakkor a fehérje Ca^{2+} -érzékenységét csak kis mértékben csökkentették. A foszforilációt, mint másik lehetséges Ca^{2+} -igény csökkentő tényezőt

Drosophila kalpainok esetében még nem írták le. Tekintettel arra, hogy az emlős m-kalpain foszforilálhatóságát már igazolták és bizonyították, hogy ez a poszttranszlációs módosítás befolyásolja a proteolitikus enzim aktivitását, lehetséges, hogy a *Drosophila* kalpain B is szabályozható foszforilációval.

2. 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 protein kináz A (PKA), extracelluláris jel-regulált protein kináz 1 és 2 (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

3. Anyagok és módszerek

3.1 Anyagok

A kísérletekben felhasznált vegyszerek többségét a Sigma-Aldrich cégtől szereztük be. A *S. cerevisiae* *PPZI* cDNS-t tartalmazó pSP72 vektort Prof. Joaquin Ariño-tól (Barcelonai Autonom Egyetem, Barcelona, Spanyolország); a rekombináns vad típusú, inaktív és mutáns kalpain B enzimeket ill. a MAP2c fehérjét Dr. Alexa Anitától (MTA, SZBK, Enzimológiai Intézet, Budapest); a kalpain B ellen nyúlban termeltetett szérumot Prof. Erdei Annától (ELTE, Budapest) kaptuk. A vektorspecifikus primereket (SP6 és a T7) a DNS szekvenáló laborok (MTA SZBK és BIOMI Kft) biztosították; a *CaPPZI* génspecifikus oligonukleotid primereket az Integrated DNA Technologies Incorporation-tól szereztük be. A klinikai izolátumokból származó *Candida albicans* törzsek a DEOEC Orvosi Mikrobiológiai Intézetéből származtak. A *Candida albicans* referencia törzseket az ATCC-től, az *Escherichia coli* DH5 α törzset a Novagen-től, a *Drosophila* Schneider S2 sejt vonalat az Invitrogen cégtől vásároltuk.

3.2 Módszerek

3.2.1 Tenyésztési eljárások

A *Candida albicans* referencia és klinikai törzsek tenyésztése folyékony Sabouraud tápoldatban történt. Az ATCC 10231 teszt törzs hígított tenyészetéből mikromanipulátorral különálló gombasejteket izoláltunk és egyetlen sejtből szubkulturákat növesztettünk fel. A *C. albicans* törzsek azonosítását CHROMagar Candida teszt, API ID32C panel és Micronaut-Candida rendszer felhasználásával végeztük.

A *Drosophila* Schneider S2 sejteket L-glutaminnal kiegészített rovar tápoldatban tenyésztettük, amely FBS-t ill. penicillin/streptomycin-t tartalmazott.

3.2.2 Nukleinsav vizsgáló módszerek

Genomi DNS izolálása és ellenőrzése

A genomi DNS-t a tömény gombaszuszpenzióból fenol-kloroformos módszerrel izoláltuk. A DNS koncentrációt a 260 nm-en mért fényelnyelés alapján, a DNS tisztaságát az OD₂₆₀/OD₂₈₀ arány alapján határoztuk meg, ill. agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük 1 %-os gélben.

Polimeráz láncreakció és klónozás

Az NCBI adatbázisában található *C. albicans* protein foszfatáz Z gén szekvenciája alapján oligonukleotid primereket terveztünk. A gén kb. 2,7 kbp nagyságú szakaszát Long PCR polimeráz enzimkeverékkel, a *CaPPZI* gén hipervariábilis régióját Pfu polimerázzal amplifikáltuk. Az PCR termékeket agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük.

A PCR termékeket közvetlen szekvenáláshoz Microcon YM-100 oszlop segítségével tisztítottuk. A Pfu polimerázzal előállított tompa véggel rendelkező PCR termékek klónozásához szükséges volt egy túlnyúló A-vég kialakítása. A pGEM-T Easy vektorba ligálást T4 DNS ligázzal végeztük. *E. coli* DH5 α kompetens sejteket állítottunk elő és transzformáltunk. A beépült DNS szakaszt tartalmazó plazmidot plazmid izoláló kit segítségével izoláltuk. A beépült DNS méretét a plazmid *EcoRI* restriktions enzimmel történő emésztését követően agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük.

DNS szekvenálás

A DNS szekvenálást az MTA SZBK Szegedi Biológiai Kutató Központ DNS Szekvenáló Laboratóriumában illetve Gödöllőn a BIOMI Kft-nél vektorspecifikus T7 és SP6 primerek, illetve foszfatáz-specifikus primerek felhasználásával végezték.

RFLP analízis

A *CaPPZI* gén hipervariábilis régiójának felszaporításakor keletkezett PCR termékeket közvetlenül emésztettük *AccI*, *AluI*, és *DdeI* enzimek kombinációjával. A fragmentek méretét 5 % SDS-PAGE-sel ellenőriztük.

3.2.3 Fehérje vizsgáló módszerek

A fehérje minták méretét és tisztaságát SDS-PAGE-sel ellenőriztük fehérje standard segítségével. A fehérje koncentráció mérését Bradford szerint végeztük.

Fehérje foszforiláció

Rekombináns vad típusú, inaktív és mutáns kalpain B fehérjék *in vitro* foszforilációját PKA, ERK1, ERK2 enzimekkel végeztük. Radioaktív foszforiláció esetében [$\gamma^{32}\text{P}$] ATP-t is tartalmazott a reakcióközeg. A beépült radioaktivitást Cserenkov sugárzás mérésével határoztuk meg. A ^{32}P beépülést SDS-PAGE után autoradiográfiával detektáltuk. A nem radioaktív foszforilálási reakciók után a mintákat MS analízisre küldtük.

Kalpain B *in vivo* foszforilációja során az S2 sejteket 100 %-os konfluenciáig növesztettük. A PKA útvonal stimulálása érdekében a sejteket forskolin-nal, az ERK útvonal aktiválásához EGF-fel kezeltük. Mindkét esetben calyculin-A-val gátoltuk a fehérje defoszforilációját. A kezelések után a kezelt és a kezeletlen sejteket lizáltuk, majd a centrifugálás után kapott felülúszókat immunprecipitációs kísérletekhez használtuk.

Immunprecipitáció

A kalpain B *in vivo* foszforilációját immunprecipitációval mutattuk ki. A nem specifikus kötődések elkerülése végett az S2 sejtek kezelése, majd feltárása után kapott felülúszót Protein A-Sepharose-zal előtisztítottuk. Ezzel párhuzamosan Protein A-Sepharose-t inkubáltunk anti-kalpain B antitesttel lízis pufferben, majd az előtisztított lizátumot anti-kalpain B ellenanyaggal összekapcsolt Protein A-Sepharose-zal kevertettük. A gyantát lízis pufferrel mostuk, majd SDS-mintapufferrel főztük. A minták egy részét Western blottal analizáltuk, másik részét MS vizsgálatokra küldtük.

Tömegspektrometria

A foszforiláció alkalmával ill. az immunprecipitációs kísérletek során kapott mintákat SDS-PAGE-sel választottuk el, majd a 104 kDa méretű kalpain sávokat kivágtuk. A mintákat MS analízist a DE OEC Proteomika Laboratóriuma ill. az MTA SZBK Tömegspektrometriai Laboratóriuma végezte. A foszfopeptid fragmenteket LC-MS/MS segítségével azonosították.

Kalpain B aktivitásmérés

Aktivitásméréshez a kalpain B fehérjét PKA-val, ERK 1 és ERK2 enzimekkel foszforiláltuk ill. kontroll (nem foszforilált) minták előállítására végett a fehérjét azonos körülmények között inkubáltuk kináz hozzáadása nélkül. A minták géliszűrését követően három különböző módszerrel határoztuk meg a kalpain preparátumok autoproteolitikus aktiválódását és aktivitását: fluorimetriásan, fluoreszcens szubsztrát felhasználásával; SDS-PAGE módszerrel, MAP2c szubsztrát alkalmazásával ill. autolízis alapján.

3.2.4 Adatok elemzése, kiértékelése

A DNS amplifikációhoz és a szekvenáláshoz felhasznált primereket a pDraw32 programmal terveztük. A restriktions helyek jóslása szintén ezen szoftverrel történt. A DNS és fehérje szekvencia adatok összehasonlítását a ClustalW2 szoftver segítségével végeztük el. A filogenetikai - és szekvencia analízist a MEGA 4.1 szoftver alkalmazásával készítettük. A

Drosophila kalpain B foszforilációs helyeit a Motif Scan programmal, szerkezetét az IUPred szerverrel analizáltuk. Az enzimkinetikai adatok matematikai modellezését Dr. Takács Gábor (ELTE, Elméleti Fizikai Tanszék) végezte. 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 ill. szórásának meghatározásához az Excel szoftvert (Microsoft Corporation) használtuk.

4. Eredmények és megbeszélésük

4.1 A *Drosophila melanogaster* kalpain B szabályozása foszforilációval

4.1.1 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, mely alapján öt PKA és számos ERK foszforilációs hely jelenléte valószínűsíthető. A szerkezeti jóslások bizonyítása érdekében elvégeztük a rekombináns kalpain B fehérje *in vitro* foszforilációját PKA, ERK1 és ERK2 enzimekkel, [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP felhasználásával. A reakciók során a PKA $0,20 \pm 0,09$ (n=5), az ERK1 $0,62 \pm 0,27$ (n=6), az ERK2 $0,73 \pm 0,17$ (n=7) mól foszfátot épített be 1 mól rekombináns kalpain B fehérjébe. A foszforilációs hely(ek) azonosítása érdekében [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP helyett nem radioaktív ATP-t használtunk a kalpain B foszforilációja során. A mintákat MS vizsgálatokra küldtük. A foszfopeptid fragmentek analízise során kiderült, hogy a vad típusú kalpain B fehérjében a PKA a Ser240 és Ser845, míg az ERK1/ERK2 enzimek Thr747 aminosav oldalláncot foszforilálják.

4.1.2 A kalpain B foszforilációs helyeinek lokalizációja

A *Drosophila* kalpain B 3D-s szerkezete még nem ismert. Így a humán m-kalpaint használtuk fel homológia modellezéshez és így határoztuk meg a foszforilációs helyek lokalizációját. Ennek alapján a Ser845 PKA hely a IV. domén második EF-kéz motívumában helyezkedik el. Ez ideális környezetet biztosít a PKA számára. A másik PKA hely, a Ser240 az I. domén végén található, az aktivációs hasító hely közelében. Ezt a PKA számára kevésbé kedvelt környezetben lévő oldalláncot másodlagos PKA helynek tekintettük. Az ERK1/ERK2 foszforilációs helyként azonosított Thr747 a III. és a IV. domén között elhelyezkedő ún. transzducer régióban található, amelynek kulcsszerepe van az aktiválódásban, ugyanis ezen keresztül terjed a Ca^{2+} -jel a IV. Ca^{2+} -kötő doménről a II. katalitikus domén felé. A homológia modell alapján megállapítható, hogy a PKA és ERK1/ERK2 enzimek által foszforilált aminosavak a molekula olyan régióiban foglalnak helyet, melyek szerepet játszhatnak az enzim aktivitásának és aktiválódásának szabályozásában.

4.1.3 A foszforiláció hatása az enzim aktivitására és aktiválódására

Három különböző módszert használtunk annak kiderítésére, hogy a foszforiláció miként befolyásolja az enzim aktiválódását és aktivitását. Először az aktivitást határoztuk meg nagy $[Ca^{2+}]$ mellett fluoreszcens dipeptid szubsztráttal (LY-AMC). A kinetikai görbék elemzése során azt találtuk, hogy a foszforilált formák gyorsabban aktiválódnak és nagyobb aktivitást mutatnak, mint a nem foszforilált formák. A legnagyobb hatást az ERK2 esetében kaptuk, ami valószínűleg a magasabb foszforilációs szinttel magyarázható. Ismeretes, hogy a MAP2c (mikrotubulushoz asszociált fehérje 2c) jó szubsztrátja a kalpainnak, ezért kísérleteink során MAP2c-t emésztettünk alacsonyabb $[Ca^{2+}]$ -nál. SDS-PAGE segítségével követtük a 62 kDa méretű MAP2c sáv eltűnését. Megállapítottuk, hogy a foszforilált enzim gyorsabban emészteti a szubsztrátot, tehát aktívabb, mint a nem foszforilált enzim. Azt tapasztaltuk, hogy minél kisebb a $[Ca^{2+}]$, annál jobban érvényesül a PKA foszforiláció aktivitást növelő hatása. Ezzel a módszerrel a kalpain B gyors aktiválódását nem tudtuk követni. Az autolízis vizsgálatára tervezett kísérlet során a natív 104 kDa méretű kalpain B sáv eltűnését kísértük figyelemmel az idő függvényében. Bár a foszforiláció hatása csupán kismértékű volt az enzim aktiválódására, a foszforilált kalpain B láthatóan gyorsabban aktiválódott, mint a nem foszforilált enzim. Tehát bizonyítottuk, hogy a foszforiláció egyaránt növeli a kalpain B aktiválódásának sebességét és az enzim maximális aktivitását.

4.1.4 Foszforilációt imitáló mutációk hatása a kalpain B aktivitására és aktiválódására

Elvégeztük az aktivitásméréseket foszforilációs hely mutánsokkal (T747E és S845E) is, amelyekben a pontmutációval kialakított Glu negatív oldallánca imitálta a foszforiláció hatását. A fluorimetriás mérések alapján megállapítottuk, hogy a mutáció többféle módon is befolyásolta a fehérje működését. Egyrészt növelte a kalpain B Ca^{2+} -érzékenységét, illetve a reakciósebességét. Ez az aktivitásnövekedés nagyobb volt alacsony $[Ca^{2+}]$ -nál. Kimutattuk, hogy a vad típusú enzimhez képest a mutánsok alacsonyabb $[Ca^{2+}]$ -nál aktiválódnak, továbbá kevésbé érzékenyek a $[Ca^{2+}]$ változására. Megállapítottuk, hogy a mutációk aktiválódás növekedést okoztak a vad típushoz képest. Annak ellenére, hogy a foszforiláció és a pontmutáció nem teljesen egyenértékű, a mutációs kísérletek megerősítették a foszforilációs kísérletek eredményeit.

4.1.5 Kalpain B *in vivo* foszforilációja

A kalpain B foszforilációját *Drosophila* S2 sejtvonalon is megvizsgáltuk, hogy feltárjuk az *in vitro* eredményeink lehetséges fiziológiai jelentőségét. A sejteket kináz

aktivátorokkal kezeltük, majd az immunprecipitáció és SDS-PAGE után izolált kalpain B fehérjét MS analízisnek vetettük alá. Megállapították, hogy a MAP kináz/ERK útvonalat aktiváló EGF kezelés hatására a S2 sejtekben a fehérje transzducer régiójában található Thr747 illetve az I. doménben elhelyezkedő Ser240 oldallánc foszforilálódott. Az utóbbi foszforilációjára nem számítottunk, főleg azért, mert a PKA jelátviteli útvonalat aktiváló forskolin-kezelés után nem volt kimutatható ezen hely foszforilációja. Valószínűleg az EGF-kezelés hatására az EGF-indukált Ca^{2+} -beáramlás következtében a CaMKII kináz aktiválódott és foszforilálta a Ser240-et. Kísérleteink során kimutattuk, hogy ERK1/2 enzimek *in vitro* és *in vivo* körülmények között is foszforilálják a Thr747 oldalláncot, amelyről korábban igazoltuk, hogy szerepet játszik az enzim aktiválásában és aktivitásában.

4.2 A *Candida albicans* protein foszfatáz Z1 gén polimorfizmusának vizsgálata

4.2.1 A C. albicans PPZ gén azonosítása Southern hibridizációval

Az irodalmi adatok és NCBI adatbázisában szereplő információ alapján a *C. albicans*-ban a protein foszfatáz Z-t kódoló gén egy kópiában fordul elő. Southern hibridizációs kísérleteink megerősítették, hogy a *C. albicans*-ban egyetlen *PPZI* gén van, amelyet *CaPPZI*-nek neveztünk el.

4.2.2 A CaPPZI gén polimorfizmusa

A *CaPPZI* gén szekvenciája alapján tervezett oligonukleotid primerek és a *C. albicans* törzsekből izolált genomi DNS felhasználásával PCR segítségével amplifikáltuk, majd klónoztuk és szekvenáltattuk a gént tartalmazó kb. 2,7 kbp hosszúságú genomi DNS szakaszt. A DNS szekvenciák analízise során megfigyeltünk, hogy a szekvenciák több ponton is eltértek egymástól és az adatbázisban lévő szekvenciáktól. Különbségeket kaptunk akkor is, amikor egy adott törzsből származó klónok szekvenciáit elemeztük. Ezért az ATCC 10231 referencia törzsből különálló *C. albicans* sejteket izoláltunk és egyetlen sejtből növeltünk fel szubkulturákat, melyekből a klónozás után nyert szekvencia részleteket egyértelműen két csoportba tudtuk osztani. Igazoltuk tehát, hogy a vizsgált diploid törzs heterozigóta a *CaPPZI* génre nézve és a kimutatott két új allélt a *CaPPZI-2* és *CaPPZI-3* jelzővel láttuk el. Az adatbázisban található CaO19.726 szekvenciának a *CaPPZI-1* allél nevet adtuk. Ezután egy klinikai mintában sikerült a gén újabb, negyedik allélját azonosítanunk, amelyet *CaPPZI-4*-nek neveztünk el. Kísérleteink során bebizonyosodott, hogy a kontroll törzsben kimutatott szekvencia variációk a klinikai gyakorlatból származó mintákban is előfordulnak. Megállapítottuk, hogy az eltérések (nukleotidcsere, inzerció,

deléció) a gén kódoló és nemkódoló régióiban is előfordulnak. A legnagyobb variabilitást a *CaPPZ1* gén 3'-nemkódoló régiója mutatta.

4.2.3 A genetikai polimorfizmus szerkezeti vonatkozásai

A *CaPPZ1* gén kódoló régiójában található nukleotid eltérések következtében kilenc aminosavcsere jött létre a PPZ1 fehérjék elsődleges szerkezetében. A PPZ rendezetlen N-terminális regulációs doménjéről nem áll rendelkezésünkre 3D-s szerkezet, így nem tudjuk megjósolni a polimorfizmus hatását. Viszont a nyúl vázizom PP1 katalitikus alegység atomi koordinátái alapján homológia modellezéssel sikerült megjósolni a fehérje C-terminális katalitikus doménjének szerkezetét. Ennek segítségével arra a következtetésre jutottunk, hogy a katalitikus centrumhoz közel helyezkedő Asp261Asn aminosavcsere befolyásolhatja az enzim aktivitását, az enzim szerkezetét biztosító β -redők területén található Cys337Arg váltás módosíthatja az enzim stabilitását, míg a fehérje felszínén lévő Gly333Glu csere minden bizonnyal nincs hatással a foszfatáz működésére. Ezen kívül több különbség található a gén nemkódoló régióiban is, azonban ezen eltérések jelentőségét nem ismerjük. Mindenesetre megállapítható, hogy a *C. albicans* törzsek heterozigótasága, az allélkombinációk és sporadikus pontmutációk okozta mikrovariabilitás fokozza az opportunistá patogén gomba génkészletének sokoldalúságát.

4.2.4 Klinikai *C. albicans* izolátumok genotipizálása

A *CaPPZ1* gén polimorfizmusának vizsgálata alapján azt találtuk, hogy a hipervariábilis régióban található jellegzetes szekvencia eltérések elemzése alkalmas lehet *C. albicans* klinikai izolátumok genotipizálására. Feltevésünk igazolása érdekében a DEOEC Orvosi Mikrobiológiai Intézetének *Candida* gyűjteményéből véletlenszerűen kiválasztottunk 14 db szisztémás candidiasis-ban szenvedő betegből származó *C. albicans* izolátumot. A DNS szekvenálás eredményét RFLP analízissel erősítettük meg. A tipikus szekvencia motívumok alapján olyan restrikciós enzimeket választottunk, melyek az egyes allélokra nézve szekvenciaspecifikusak voltak. A DNS szekvenálás és az RFLP segítségével azt kaptuk, hogy mindössze öt *CaPPZ1* allélkombináció fordul elő az általunk vizsgált *C. albicans* törzsekben. Két páciensnél nem egyezett a vérből és a fertőzés helyéről származó izolátum genotípusa, ami minden valószínűség szerint nozokomiális fertőzéssel magyarázható. A munkánk bebizonyította, hogy a *CaPPZ1* gén 3'-nemkódoló hipervariábilis régiójának polimorfizmusa jó eszköz lehet klinikai izolátumok genotipizálására és a fertőzés eredetének azonosítására.

5. 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 összhangban Southern blot kísérlettel igazoltuk, hogy a *C. albicans*-ban egyetlen PPZ gén található, amelyet *CaPPZI*-nek neveztünk 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 régió 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.

6. Közlemények

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

László Kovács*, Anita Alexa*, Eva Klement, Endre Kókai, Ágnes Tantos, Gergő Gógl, Tamás Sperka, Katalin F. Medzihradzky, József Tözsér, Viktor Dombrádi and Péter Friedrich (2009). Regulation of Calpain B from *Drosophila melanogaster* by Phosphorylation. *FEBS J* 276 (17):4959-72. IF: 3.139

* megosztott első szerzők

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 plenáris 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, Tözsér 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, Medzihradszky 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, Medzihradszky 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