

Kalpainok szabályozása: az enzim aktiválása *in vitro* és irányítása *in vivo*

Doktori (PhD.) értekezés

Bozóky Zoltán

**Témavezető: Dr. Friedrich Péter
tudományos tanácsadó,
az MTA rendes tagja**

**Eötvös Loránd Tudományegyetem
Biológiai Doktori Iskola (A Doktori Iskola Vezetője: Dr. Erdei Anna),
Szerkezeti Biokémia Doktori Program (A program vezetője: Dr. Gráf László)**

**Kutatóhely:
Magyar Tudományos Akadémia
Szegedi Biológiai Központ
Enzimológiai Intézet**

**Budapest
2008**

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm **Friedrich Péternek**, témavezetőmnek, hogy laborjában, közvetlen irányítása alatt végezhettem munkámat.

Köszönettel tartozom **Alexa Anitának**, hogy megtanított a biokémia és molekuláris biológia gyakorlati alkalmazására, valamint hogy közösen dolgozhattam vele.

Köszönöm **Farkas Attilának**, hogy mindig fordulhattam hozzá kérdéseimmel, és komoly segítségét a sejtis munkák során.

Köszönöm **Csizmók Veronikának**, hogy megosztotta velem szakmai tapasztalatait, és segített leküzdeni a munkám útjába álló akadályokat.

Köszönöm **Tompa Péternek**, hogy felügyelte munkámat, és kérdéseimmel fordulhattam hozzá.

Köszönöm **Magyar Istvánnak**, **Róna Gergelynek** és **Dancsok Júliának**, hogy segítettek a 2D-os gélelektroforetikus kísérletek beállításában.

Köszönöm segítségét **Bíró Évának**.

Hálával gondolok a Friedrich- és a Tompa-csoport valamennyi volt és jelenlegi tagjára, akik elősegítették, hogy jó hangulatban és környezetben végezhessem munkámat.

Köszönöm **Klement Évának** és **Medzihradszky Katalinnak** a tömegspektrometriás fehérjeazonosításokat.

Köszönettel tartozom **Vértessy Beátának** és **Varga Baláznak**, hogy tiszta dUTPáz fehérjepreparátumokat bocsátottak rendelkezésemre.

Köszönöm **Gráf Lászlónak**, az ELTE Biológiai Doktori Iskola, Szerkezeti Biokémia program vezetőjének.

És végül, de nem utolsó sorban köszönöm **családomnak**, hogy töretlen bizalmukkal segítették munkám elvégzését és stabil hátteret biztosítottak kutatásaimhoz.

Tartalomjegyzék

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	2
TARTALOMJEGYZÉK	3
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
I. BEVEZETÉS	7
II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	9
II.1. KALPAIN FORMÁK	9
II.1.1. <i>Humán kalpain formák</i>	9
II.2. A KALPAIN SZERKEZETE	9
II.2.1. <i>A nagy alegység</i>	10
II.2.2. <i>A kis alegység</i>	13
II.2.3. <i>Drosophila kalpain formák</i>	14
II.3. KALPAIN SZABÁLYOZÁS	17
II.3.1. <i>Autolízis</i>	17
II.3.2. <i>Aktiválódáshoz szükséges kalcium igény</i>	17
II.3.3. <i>Kalciumkötő képesség</i>	18
II.3.4. <i>Foszfolipidek</i>	19
II.3.5. <i>Foszforiláció</i>	20
II.3.6. <i>Szubsztrát specifitás</i>	20
II.3.7. <i>A kalpain természetes inhibitora, a kalpasztatín</i>	21
II.3.8. <i>Szintetikus kalpain inhibitorok</i>	22
II.4. FIZIOLÓGIÁS ÉS PATOLÓGIÁS FUNKCIÓK	23
II.4.1. <i>In vitro szubsztrátok</i>	23
II.4.2. <i>In vivo szubsztrátok</i>	24
II.4.3. <i>Szubsztrátkeresés Drosophilában</i>	24
II.4.4. <i>Betegségek és a kalpain</i>	24
II.5. KÉTDIMENZIÓS GÉLELEKTROFORÉZIS	25
III. CÉLKITŰZÉSEK	27
IV. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	28
IV.1. „EXTENDED TRANSDUCER” MODELL	28
IV.1.1. <i>Mutások előállítása</i>	28
IV.1.2. <i>Fehérje kifejeztetés és tisztítás</i>	30
IV.1.3. <i>Fluorimetriás aktivitásmérés</i>	31
IV.2. KALPAIN SZUBSZTRÁT KERESÉS	32
IV.2.1. <i>Drosophila sejt kultúra fenntartás</i>	32
IV.2.2. <i>Endogén kalpain formák immunológiai detektálása</i>	32
IV.2.3. <i>Kalpain aktivitásmérés</i>	33
IV.2.4. <i>2D gélelektroforézis</i>	33
IV.2.5. <i>2D gél kiértékelés</i>	34
IV.2.6. <i>Tömegspektrometriás azonosítás</i>	34
IV.2.7. <i>Szubsztrát fehérjék rekombináns előállítása</i>	34
IV.2.8. <i>In vitro emésztési kísérletek</i>	35
IV.3. VEGYSZEREK	35
V. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	36
V.1. SAVAS HUROK ÉS AZ „EXTENDED TRANSDUCER” MODELL	36
V.1.1. <i>Savas hurok mutások</i>	36
V.1.2. <i>Transducer mutások</i>	38
V.1.3. <i>Aktivitásmérések</i>	39
V.1.4. <i>A modell („Extended transducer”)</i>	43
V.2. KALPAIN SZUBSZTRÁT KERESÉS	45
V.2.1. <i>A keresési módszer elve</i>	45
V.2.2. <i>Endogén kalpain formák immunológiai detektálása</i>	45

V.2.3. Kalpain aktivitásmérés.....	46
V.2.4. Reprodukálhatósági teszt	47
V.2.5. Azonosított szubsztrátok	49
V.2.6. A szubsztrátok ellenőrzése.....	54
V.2.7. Kalpain szubsztrát keresés összefoglalása	55
VI. ÖSSZEFOGLALÁS	57
VII. IRODALOMJEGYZÉK.....	59
ÖSSZEFOGLALÓ.....	75
SUMMARY	76
FÜGGELÉK.....	77

Rövidítések jegyzéke

AMPA	alpha-amino-3-hidroxi-5-metil-4-izoxazol-propionsav
BA	Benzamidin
β -ME	β -merkapoetanol
CSS1	Calpain Small Subunit 1 - Egyes típusú kalpain kis alegység
DabcyI	4-((4-(dimetilamino)fenil)azo)benzoesav
DTE	1,4-ditioeritritol
E64	Irreverzibilis kapain inhibitor
EDANS	5-((2-aminoetil)amino)naftalén-1-szulfonsav
EGF	Epidermális növekedési faktor
FRET	Fluorescence resonance energy transfer - Fluoreszcencia rezonanciás energia átadás
GLUT4	Inzulin által szabályozott glükóz transzporter
IPG	immobilized pH gradient - immobilizált pH gradiens
IPTG	Izopropil- β -D-1-tiogalaktopiranóz
IUPred	Prediction of Intrinsically Unstructured Proteins – Fehérjerendezetlenség jósló szoftver (http://iupred.enzim.hu/)
LC-MS	Folyadék kromatográfia összekötve egy tömegspektrometriás azonosítással

MAP2	Mikrotubulushoz asszociált fehérje, 2-es forma
NiNTA	Nikkel-nitrulo-triacetsav – His affinitáskromatográfiához használt agaróz alapú oszlopgyanta
PBS	Phosphate buffered saline – foszfát alapú puffer
PD150606	Kalpain inhibitor
PDB	The Protein Data Bank – Fehérje adatbázis (http://www.rcsb.org/pdb/)
PKC	Ca ²⁺ aktivált fehérje kináz
PMSF	Fenil-metil-szulfonil-fluorid
PONDR	Predictor Of Naturally Disordered Regions Fehérjerendezetlenség jósló szoftver (http://www.pondr.com/)

I. Bevezetés

A kalpainat a 60-as évek közepén fedezték fel patkányok agyában (Guroff 1964) és vázizmában, mint egy kalcium-ionok által aktivált neutrális proteázt („calcium-activated-neutral protease” CANP). Intracellulárisan elhelyezkedő fehérjebontó enzim, melynek aktivitás optimuma a neutrális pH környékén van. A kalpain nevet (**k**alcium-ionok által aktivált **p**apainserű proteáz) 1984-ban kapta (Ohno és mts. 1984). A kalpain szabályozó proteáz, mely ellentétben sok más fehérjebontó enzimmel, szubsztrátjait csak limitáltan bontja, így módosítva azok funkcióját. Felfedezése óta számos fajban leírtak különböző kalpainokat, számos forma és splice variáns létezik, így gyakorlatilag egy önálló enzimesaládot alkot (EC 3.4.22.52-54). Csoportunk nevéhez fűződik az enzim felfedezése *Drosophilában* (Pinter és Friedrich 1988) és a *Drosophila* kalpainok jellemzése (Jekely és Friedrich 1999, Spadoni és mts. 2003, Theopold és mts. 1995).

A kalpain kutatásának fontosságát az enzim betegségekben betöltött szerepe indokolja. Az izomdisztrófia (Branca 2004), az Alzheimer- (Huang és Wang 2001) és Parkinson-kór (Dufty és mts. 2007), a szemlencse egyes megbetegedései (Fukiage és mts. 2002), a II-es típusú cukorbetegség egyes formái (Branca 2004), mind-mind olyan betegségek, melyekben a kalpain abnormális (túl erős, vagy elégtelen) aktivitása okozza a problémát. Ezért a kalpainok vizsgálata és behatóbb megismerése orvosi biológiai haszonnal járhat.

A kalpainok nagy méretű, több doménből felépülő fehérjék, szerkezetüket több röntgenkristallográfiai tanulmányban is vizsgálták (Hosfield és mts. 1999, Strobl és mts. 2000), ám a teljes kalpain szerkezetet kalcium-ionok jelenlétében nem sikerült meghatározni (Pal és mts. 2001). Ugyanakkor ismerjük az izolált kalpain domének kalcium kötött állapotát (Blanchard és mts. 1997, Moldoveanu és mts. 2003), azonban mind a mai napig nem tudni, hogy aktív állapotában hogyan néz ki a teljes enzim.

A sejteletani folyamatokban betöltött szerepe miatt, a kalpain fontos és veszélyes enzim a sejtben, melynek aktivitását pontosan szabályozni kell. A kalpain aktivitás szabályozása igen sokrétű: endogén inhibitor, kalcium-ion koncentráció, autolízis, foszforiláció, mind-mind olyan szabályozási eszközök, amik a kalpain aktiválódást és aktivitást befolyásolják.

A kalpain kutatás két nagyon alapvető és még nyitott kérdése, hogy hogyan szabályozódik az élő sejtben a kalpain, illetve, milyen fiziológiás funkciói vannak, azaz mik az *in vivo* szubsztrátjai (Goll és mts. 2003). Munkám során ennek a két kérdésnek a megválaszolásában szeretnék jelentős lépéseket tenni. Arra kerestem a választ, hogy a kalpain aktiválódás milyen mechanisztikus lépéseken keresztül zajlik (hol vannak az

enzimaktiválódás kulcspontjai), illetve, hogy *in vivo* milyen folyamatokat irányít (mik a fiziológias szubsztátjai).

II. Irodalmi áttekintés

A kalpain család különböző expressziós mintázatú, egy vagy két alegységből felépülő, cisztein proteázok heterogén csoportja, melybe ubikviter előfordulású és szövetspecifikus formák is tartoznak. A kalpainok számos intracelluláris, kalcium-ion szabályozta folyamatban vesznek részt, mint például a jelátvitel, a sejtosztódás és differenciálódás, az apoptózis, a tumor metasztázis, és a sejtvárandulás (Goll és mts. 2003). Az enzim inaktív proenzimként keletkezik a sejtben és kalcium-ionok hatására N-terminális autolízissel aktiválódik.

II.1. Kalpain formák

II.1.1. Humán kalpain formák

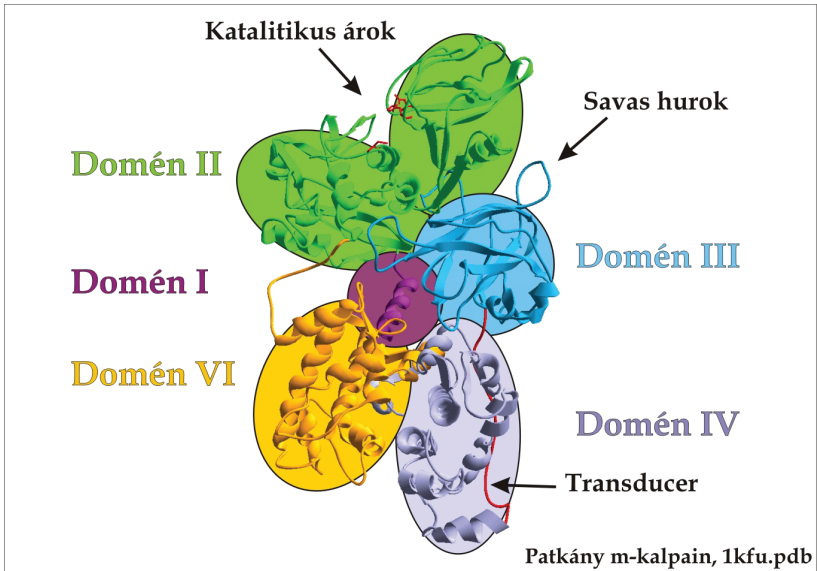
A humán genom szekvenálás befejezésével biztossá vált, hogy emberben 16 gén sorolható a kalpain családba, ebből 14 nagy alegységet, 2 pedig kis alegységet kódol (Függelék 1. táblázat). Ezek közül a kalpain 1, 2, 3, 8, 9, 11, 12 és 13 négy doménből álló fehérjék, melyeket felépítésük miatt tipikus kalpainoknak nevezünk. A kalpain 1, 2 és 9 heterodimert alkot egy ún. kis alegységgel, azonban a kalpain 3, 8, 11, 12, annak ellenére, hogy hasonló felépítésű enzimek, nem lépnek kölcsönhatásba a kis alegységgel. A kalpain 5, 6, 7, 10 és 15 atipikus kalpainok, melyekből domének hiányoznak, vagy más domének szerepelnek bennük, mint a tipikus kalpainokban és nem képesek a dimerizációra a kis alegységgel.

A kalpainok citoszolban elhelyezkedő enzimek. A kalpain 1, 2, 5, 7, 10, 13 és 15 ubikviter, minden szövetben előforduló proteázok, míg a kalpain 3, 6, 8, 9, 11 és 12 szövetspecifikus formák.

II.2. A kalpain szerkezete

A tipikus kalpainok legismertebb és legtöbbet vizsgált tagjai, az ubikviter előfordulású kalpain 1 és 2 (μ - és m-kalpain), két alegységes fehérjék. Egy 80 kDa-os nagy és egy 30 kDa kis alegységből állnak. A fehérje adatbázisban (The Protein Data Bank: <http://www.rcsb.org/pdb/>) található 28 eddig meghatározott kalpain röntgenszerkezet közül 22 e két fehérjének, vagy fragmenseinek szerkezete (1. ábra).

Mivel nem ismert a teljes kalpain kalcium-ionokat kötött formájának röntgenszerkezete, ezért nincs pontos képünk arról, milyen konformációs változások következnek be az ionok kötődésekor.



1. ábra: A teljes hosszú kalpain röntgenszerkezete. Pirossal a katalitikus centrum és az ún. transducer szakasz.

II.2.1. A nagy alegység

A katalitikus aktivitásért felelős aminosavak (Cys, His, Gln) a négy doménból felépülő nagy alegységben találhatóak, ami mind az m-, mind a μ -kalpain esetében 80 kDa méretű.

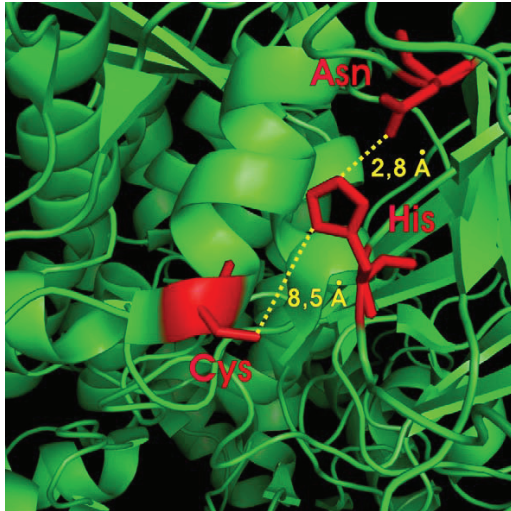
II.2.1.1. Az N-terminális domén, Domén I

A kalpainok egyik jellegzetessége, hogy a katalitikus domén előtt egy, az adott kalpain formára jellemző N-terminális domén található, melynek mérete igen szélsőséges határok között mozog (például az emlős m-kalpainban 19, a *Drosophila* kalpain B-ban 260 aminosav méretű). A domén szerepét nem ismerjük pontosan, de a kalpain aktiválódásakor az enzim belehasít ebbe a doménbe.

II.2.1.2. A katalitikus domén, Domén II

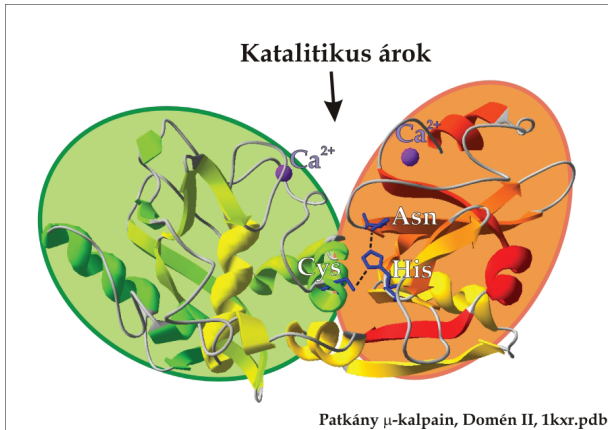
A II-es domént a katalitikus árok választja ketté, így a katalitikus domén elnevezés inkább funkcionális, mint szerkezeti egységre utal. A proteolitikus hasításért felelős aminosavak közül a cisztein a szubsztrátkötő zseb egyik, míg a hisztidin és glutamin a másik

oldalán található, melyek az inaktív proenzimben 10 angström távolságban helyezkednek el (2. ábra).

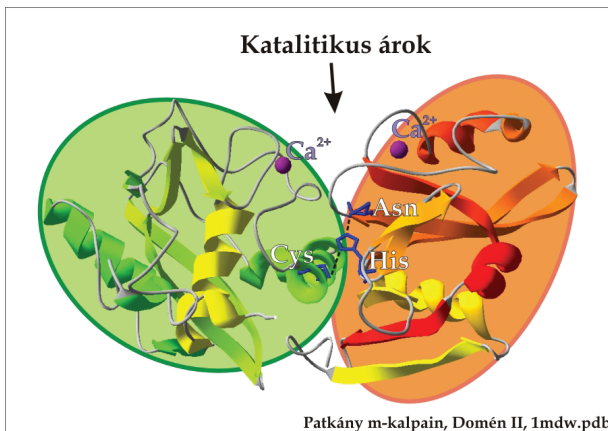


2. ábra: A kalpain szerkezete a katalitikus árokba nézve. Pirossal a katalitikus aminosavak

Ez a távolság magyarázatot ad arra, hogy a proenzim miért inaktív. A funkcionális aminosavak túlságosan messze helyezkednek el a katalitikus hatás kifejtéséhez, azaz az enzim aktiválódásakor a katalitikus ároknak össze kell zárulnia. Moldoveanu és munkatársai sikeresen megoldották a kötött kalcium-iont tartalmazó katalitikus domén röntgenszerkezetét (Moldoveanu és mts. 2002, Moldoveanu és mts. 2003), melyből kiderült, hogy egy II-es domén két kalcium iont képes megkötni, melyek stabilizálják a peptidláncot a szubsztrátkötő zseb két oldalán (3. és 4. ábra) (Moldoveanu és mts. 2004).



3. ábra: A patkány μ -kalpain katalitikus doménje kalciumkötött (kalcium - lila) formában



4. ábra: A patkány m -kalpain katalitikus doménje kalcium-ion (kalcium - lila) kötött formában

II.2.1.3. A szabályozó domén, Domén III

A molekula közepén elhelyezkedő III-as domén szekvenciájához hasonló nem található más ismert fehérjében, ám a röntgenszerkezetek megoldása után kiderült, a domén nagyfokú szerkezeti analógiát mutat az ún. C2-es doménnel. Az antiparallel β -szendvics szerkezetű C2-es domént először a protein kináz C-ben fedezték fel, de azóta számos más, kalcium ionok által szabályozott fehérjében megtalálták (Rizo és Sudhof 1998). A C2-es domén egy kalcium

és foszfolipidkötő domén, mely tulajdonságokat a kalpain izolált III-as doménjéről is kimutatták (Tomba és mts. 2001).

A domén jellegzetessége az antiparallel β -szendvics mag, melynek két oldalán két ellentétes töltésekben gazdag hurok régió található. Az m-kalpain esetén 392-404 aminosavak közötti szekvencia savas aminosavakban gazdag (10 darab Asp és Glu a 13 aminosav hosszúságú hurokban), míg a 414-427 aminosavak közötti szakaszon többségben bázikus aminosavakat találunk (8 darab Arg, Lys, vagy His a 14 aminosavas régióban).

II.2.1.4. A kalmodulinszerű domén, Domén IV

A IV-es domén, hasonlóan a VI-os doménhez, kalmodulinszerű kalciumkötő domén, mely öt EF-hand motívumot tartalmaz (a kalmodulin és a μ - valamint az m-kalpain IV-es domén szekvenciákat összevetve 24-44%-ban azonos, illetve 51-54%-ban hasonló aminosavakat találunk). Ebből négy kalciumion kötő, egy pedig, a kis alegységgel való dimerizációért felelős motívum (Graham-Siegenthaler és mts. 1994).

II.2.2. A kis alegység

A heterodimer felépítésű kalpainok jellegzetessége, hogy a különböző típusú nagy alegységek ugyanazzal a kis alegységgel alkotnak komplexet, ez az általánosan ismert 30 kDa-os kis alegység (CSS1). Csoportunknak sikerült egy új, 28 kDa-os kis alegységet azonosítani (CSS2), mely főként az N-terminális doménben különbözik a CSS1-től (Schad és mts. 2002). Mindkét kis alegység két domént tartalmaz (az V-ös és VI-os domén). A CSS1 knock-out kísérletek sokáig sikertelenek voltak, így azt feltételezték, hogy a kis alegység hiánya letalitást okoz (Arthur és mts. 2000, Zimmerman és mts. 2000), ám azóta sikerült életképes CSS1 knock-out patkányokat létrehozni (még nem publikált adat).

II.2.2.1. A glicingazdag domén, Domén V

A kis alegység N-terminális doménje egy hidrofób domén, a CSS1 esetében 101 aminosavat tartalmaz. Ebből 40 glicin, 5 prolin, és 30 egyéb hidrofób aminosav, szemben a 26 poláros vagy töltött aminosavval. A magas glicintartalom a domén foszfolipidkötő képességére utal, melynek a lokalizációban lehet szerepe (Arthur és Crawford 1996). Kimutatták, hogy a kis alegység chaperon-ként funkcionál a nagy alegység számára, azaz segíti annak helyes feltekeredését, melyben az V-ös domén nagyrészt rendezetlen szerkezete is szerepet játszhat (Moldoveanu és mts. 2002, Yoshizawa és mts. 1995). Szintén a

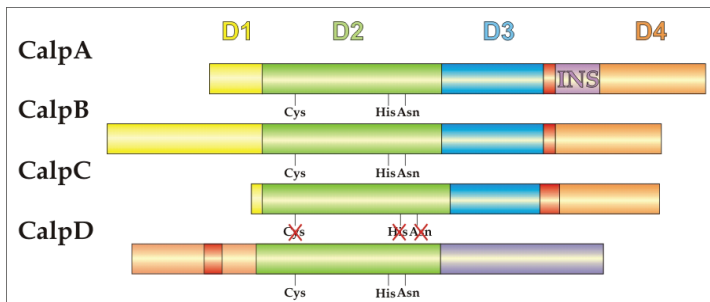
rendezetlenség következménye, hogy az eddig meghatározott röntgenszerkezetek egyikén sem látszik az V-ös domén.

II.2.2.2. A kalmodulinszerű domén, Domén VI

A kis alegység VI-os domén, hasonlóan a IV-es doménhez, nagyfokú hasonlóságot mutat a kalmodulin kalciumkötő fehérjével. Őt EF-hand motívumot tartalmaz, melyből négy a kalcium kötésért, egy pedig, a nagy alegységgel való dimerizációért felelős (Graham-Siegenthaler és mts. 1994). A legnagyobb különbség a IV-es és VI-os domén között, hogy az N-terminálisukon lévő α -hélix a IV-es domén esetében három, míg a VI-os domén esetében négy csavarmenetet tartalmaz.

II.2.3. *Drosophila* kalpain formák

Drosophilában négy kalpain gén található, a kalpain A, B, C és D. Ezek közül kettő katalitikusan aktív, tipikus kalpain (kalpain A és B), egy tipikus, de inaktív forma (kalpain C) és egy pedig egy atipikus enzim (kalpain D). Muslicában nem található kis alegység, így a *Drosophila* kalpainok feltehetőleg monomer enzimek. Hasonlóan az emlős kalpainokhoz a katalitikusan aktív *Drosophila* kalpainok is autolízisen mennek keresztül az aktiválódás során (5. ábra).

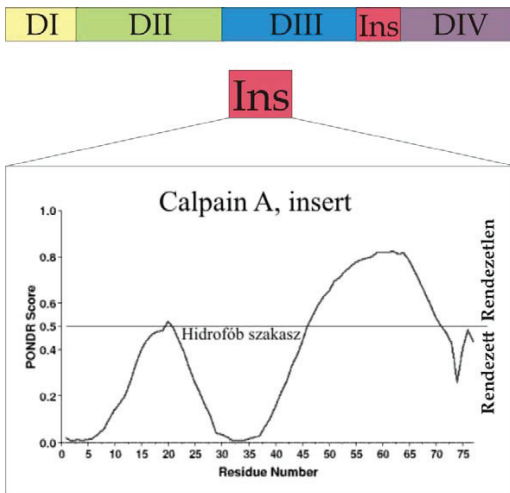


5. ábra: A *Drosophila* kalpainok doménszerkezete

II.2.3.1. Kalpain A

A kalpain A a második kalpain forma, melyet *Drosophilában* felfedeztek (Theopold és mts. 1995) és az első melyet laborunkban klónoztak meg először (Pinter és Friedrich 1988). Az katalitikusan aktív tipikus kalpain A ubikviter előfordulását, 94 kDa méretű, négy doménből felépülő fehérje. Szekvenciájának különlegessége a hosszú, 54 számú aminosavból

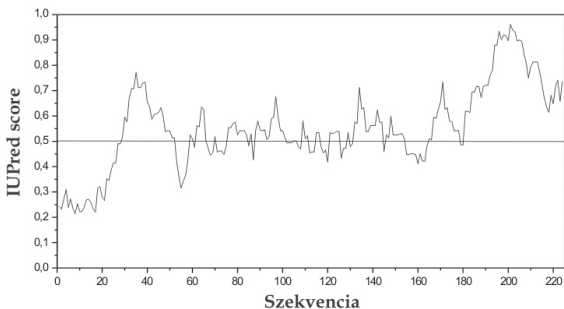
álló, N-terminális domén, valamint a harmadik és negyedik domén közötti 76 aminosav hosszú szakasz, mely más kalpain szekvenciában nem fordul elő. Elvégezve ezen szakasz PONDR rendezetlenségi jóslását, az inszert két szélén inkább rendezetlenségre hajlamos, míg a közepén egy erősen rendezett struktúra található, melyben sok hidrofób aminosavat találunk (6. ábra). Feltételezések szerint ez egyfajta horgonyként szolgálhat az enzim számára.



6. ábra: A kalpain A doménszerkezete és inszertációs szakaszának PONDR rendezetlenségi jóslása. A 0,5 feletti PONDR pontérték rendezetlen az az alatti rendezett szerkezetre utal.

II.2.3.2. Kalpain B

A második laborunkban megklónozott *Drosophila* kalpain forma a kalpain B (Jekely és Friedrich 1999), mely egy 104 kDa-os, ubikviter előfordulású, tipikus felépítésű kalpain. Jellegzetessége, az extrém hosszú, 224 aminosavból álló, N-terminális domén, melyben 49 darab prolin található és erősen rendezetlen hajlamot mutat (7. ábra).



7. ábra: A kalpain B N-terminális doménjének IUPred rendezetlenségi jóslása. A 0,5 alatti IUPred pontérték rendezett állapotra, míg az a feletti rendezett állapotra utal.

II.2.3.3. Kalpain C

A kalpain C, a *Drosophila* inaktív kalpain formája, ami mindkét aktív muslica kalpainnal összevetve 33,5%-ban azonos, vagy erősen hasonló aminosavat tartalmaz, azonban a katalitikus aktivitásért felelős aminosavak más aminosavakkal vannak helyettesítve (Cys → Arg; His → Val; Asn → Ser), így ez egy biztosan inaktív forma (Spadoni és mts. 2003).

Egy szisztematikus munkában inaktív enzimek funkcióját vizsgálták (Pils és Schultz 2004), vagyis olyan enzimeszaladokat kerestek, melyeknek sok tagja van, és a szekvenciák alapján megjósolták, hogy aktívak-e a különböző enzimformák. Azt találták, hogy a jelátvitelben szerepet játszó enzimeszaladok tolerálják legjobban az inaktív tagok jelenlétét, míg a magi enzimek a legkevésbé, azaz a jelátvitel a legflexibilisebb, és a magi folyamatok a legkonzerváltabbak a vizsgált csoportok között. Ebben a tanulmányban vizsgálták a kalpain családot is. Azt jósolták, hogy *Drosophilában* egy inaktív és három aktív forma van, ami megfelel jelenlegi ismereteinknek. Ugyanezen vizsgálat szerint az emberi kalpainok között tíz aktív és egy inaktív forma létezik. Az inaktív enzimek nagy száma és konzerváltsága azt mutatja, hogy az ezen enzimek valamilyen szabályozási folyamatban vesznek részt és valószínűsíthető, hogy az eddig még ismeretlen funkciójú inaktív enzim homológok is hasonló folyamatokban játszanak szerepet (Pils és Schultz 2004), azaz a kalpain C is egy szabályozó enzim.

II.2.3.4. Kalpain D

A kalpain D (más néven SOL) volt az első kalpain forma, melyet *Drosophilában* felfedeztek. Repülési és járási rendellenességei voltak azoknak a legyeknek, melyek mutációt hozdortak a kalpain D génben (Delaney és mts. 1991). A mozgási problémákat az érző idegpályák fejlődési zavari okozták. A kalpain D-vel homológ fehérjét emlősökben, így emberben is találtak (SOLH), ami szintén idegrendszeri előfordulást mutat (Kamei és mts. 2000).

A kalpain D szekvenciája nagymértékben különbözik a többi ismert kalpainétól, a kalpainokra nem jellemző DNS-kötő cink-finger motívumokat is tartalmaz.

II.3. Kalpain szabályozás

A kalpain, lévén egy szabályozó proteáz, igen veszélyes fegyver a sejtben. Az intracelluláris kalciumion koncentráció bármily okból történő növekedése aktiválhatja a kalpaint, mely a fiziológiás szubsztrát hasításon túl patológiás, kontrollálatlan és irreverzibilis fehérjebontást is előidézhethet. Ennek kivédésére a kalpain aktiválódási mechanizmusának számos szabályozási pontja van.

II.3.1. Autolízis

A kalpain inaktív proenzimként szintetizálódik a sejtben. Az enzim kalcium-ionok hatására aktiválódik, aminek egyik első lépése az autolízis. Ez egy önhasítási folyamat, melynek során a kis és a nagy alegység N-terminális doménjéről is lehasad egy-egy peptid (Saido és mts. 1994, Suzuki és mts. 1981). Ez az m- és a μ -kalpain esetében is egy két lépcsőben lejátszódó folyamat. Az m-kalpain esetében először egy 9, majd egy 10 aminosavból álló peptid hasad le, míg a μ -kalpain esetén először egy 14, majd egy 12 aminosavas darab távozik. A *Drosophila* Kalpain B esetében is két autolitikus hely van, a 74. és a 224. aminosav után hasad el a peptidlánc az aktiválódás során. Irányított mutagenézis kísérletekkel kimutatták, hogy az autolízis akkor is lejátszódik, ha ezeket az autolízis helyeket megszüntetik, csak ekkor két új helyen, a korábbi hasítóhely előtt (215.) valamint után (230.) történik a hasítás (Farkas és mts. 2004). Az autolizált kalpain katalitikusan aktívvá válik és alacsonyabb kalcium-ion koncentráció is elégséges az aktivitásához.

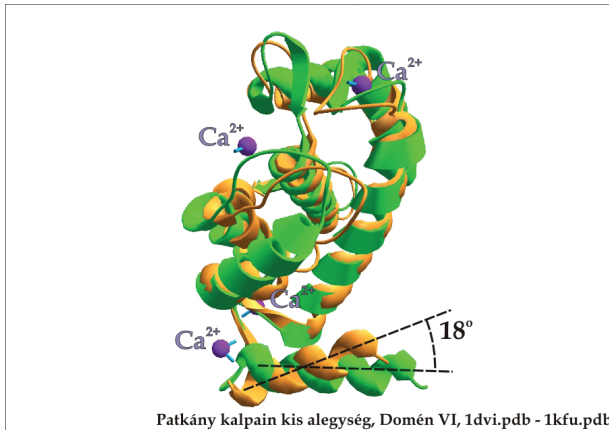
II.3.2. Aktiválódáshoz szükséges kalcium igény

Az inaktívan képződő kalpain proenzim aktiválódásához kalcium-ionok szükségesek. A két legtöbbet vizsgált kalpain forma, az aktiválódásukhoz szükséges kalcium-ion

koncentrációról kapta a μ - és m-kalpain (kalpain 1 és kalpain 2) elnevezést, miszerint mikromoláris, illetve millimoláris Ca^{2+} -ion koncentráció szükséges az aktiválódásukhoz. Kicsit szokatlan egy intracelluláris enzimtől, hogy a sejtekben átlagos 10-100 nM nyugalmi Ca^{2+} -ion koncentrációnál 3-5 nagyságrenddel magasabb koncentrációnál aktiválódik. Ezt az ellentmondást mind a mai napig nem sikerült feloldani. A legvalószínűbb magyarázat erre, hogy a kalciumon kívül más faktork is csökkentik az aktiválódás kalcium igényét, ilyen lehet például a foszforiláció, illetve hogy a kalcium csatornák közelében lokálisan magasabb lehet a kalcium-ion koncentrációja, ami aktiválhatja az egyes kalpain formákat. Megfigyelték továbbá, hogy a különböző kalpain formák egymást is képesek aktiválni (Tompa és mts. 1996).

II.3.3. Kalciumkötő képesség

A kalpainban több kalciumkötő motívum is található. Ilyenek a IV-es és VI-os kalmodulinszerű doménben található EF-hand motívumok, melyekből öt található egy-egy doménben. Ebből az ötből csak négy felel a kalcium kötésért, egy a kis alegységgel való dimerizációt teszi lehetővé. A μ - és az m-kalpain fehérjék háromdimenziós szerkezetében az EF-hand motívumok közel azonos környezetben helyezkednek el, így ez nem magyarázza, hogy miért különbözik oly nagymértékben a két forma kalcium igénye. A kalciumkötő képesség megismerésében nagy előrelépést jelentett, hogy noha a teljes enzim kalcium kötött szerkezetét nem sikerült krisztallográfiai módszerekkel meghatározni, sikeresen megoldották a VI-os domén kalciummentes és kalcium kötött formáinak szerkezetét (Blanchard és mts. 1997). Fluoreszcens vizsgálatokból tudták, hogy a kalcium kötődésekor csak kicsit módosul a VI-os domén szerkezete, melyet a röntgendiffrakciós vizsgálatok is megerősítettek. A kalciumos és kalciummentes szerkezetek között csak 1-2 Å-s elmozdulásokat találtak, egyedül az 1-es EF-hand motívumban keletkezik nagyobb elmozdulás, ahol a két hélix egymáshoz képest 18%-nyit mozdul el (8. ábra). Ez a 4,34 Å-ös változás a domén N-terminálisánál következik be (Blanchard és mts. 1997). Ehhez képest érdekes megfigyelés, hogy az 1-es EF-hand kalcium kötését mutációkkal elrontva nem változott az enzim kalciumkötési állandója. A 2-es EF-hand esetében nagyobb volt a változás, míg a 3-as EF-hand-nek volt a legnagyobb hatása az enzim kalcium kötésére (Dutt és mts. 2000).



8. ábra: A patkány m-kalpain VI-os domén kalcium kötött és kalcium mentes röntgenszerkezete egymáshoz illesztve.

A kalpain domének tanulmányozása során más doménekről is kimutatták, hogy szelektíven képesek a kalcium-ionokat megkötni. Így a II-es és a III-as doménben is találtak kalciumkötő motívumokat. A II-es katalitikus doménben két kalcium kötőhelyet azonosítottak a katalitikus árok két oldalán, melyek a katalízisért felelős aminosavak környezetét stabilizálják (Moldoveanu és mts. 2004). Izolált III-as domén kísérletek segítségével pedig a domén savas aminosavakban gazdag hurok régiójáról igazolták, hogy szelektíven képes a kalcium-ionok megkötésére (Tomba és mts. 2001).

II.3.4. Foszfolipidek

In vitro kísérletekben megfigyelték, hogy a kalpain aktiválódáshoz szükséges kalcium-ion koncentrációt a különböző foszfolipidek kevesebb, mint felére csökkentik (Arthur és Crawford 1996, Jekely és Friedrich 1999, Melloni és mts. 1996, Tomba és mts. 2001). A foszfolipid kötő helyként két régiót azonosítottak eddig, a kis alegység N-terminális régiójának 39-62 aminosavak közötti szakaszát (Crawford és mts. 1990) illetve a III-as domént (Tomba és mts. 2001).

II.3.5. Foszforiláció

A kalpain aktivitást a foszforiláció is számos ponton befolyásolja. Megfigyelték, hogy az ERK mitogén aktivált protein kináz a Ser₅₀-t foszforilálva képes aktiválni az m-kalpain, mely egy EGF (epidermális növekedési faktor) indukált foszforilációs jelpálya a sejtekben (Glading és mts. 2004). Még érdekesebb ez a jelenség annak ismeretében, hogy a μ -kalpainban nincs ebben a régióban foszforilálható aminosav, és a μ -kalpain nem is vesz részt az EGF indukálta sejtmozgásban, mint ahogy azt az m-kalpain esetében kimutatták. A foszforiláció nem csak aktiválhatja, hanem gátolhatja is a kalpain. Az m-kalpain protein kináz A-val (cAMP-vel szabályozott fehérje kináz) történő foszforilálása, például gátolja az EGF indukálta aktiválódást (Shiraha és mts. 2002).

II.3.6. Szubsztrát specifitás

A proteázok egyik jellegzetessége, hogy általában egy igen pontosan meghatározott szekvenciánál hasítják el szubsztrátjaikat. A kalpainok vonatkozásában is igaz, hogy egy adott szubsztrátot csak meghatározott helyeken hasít, azonban a különböző szubsztrátok elemzéséből kiderült, hogy nem adható meg egy általános szabály a kalpain hasítóhelyekre vonatkozóan. A különböző szubsztrátokban különböző szekvenciájú környezetben hasít a kalpain. Több összefoglaló jellegű munka is foglalkozik a kalpain felismerőhely aminosav preferenciájával, mely az ismert hasítóhelyek alapján (Tompa és mts. 2004), vagy peptidkönyvtárak elemzése által (Cuerrier és mts. 2005) próbál kalpain hasítást jósolni. Csoportunkban, ismert szubsztrátok elemzésének segítségével sikerült egy „szuper-szubsztrátot” tervezni (Tompa és mts. 2004), mely peptidszekvencia nem található meg az ismert proteómok egyikében sem, azonban szintetikusan előállítva igen jó szubsztrátnak minősült (9. ábra).

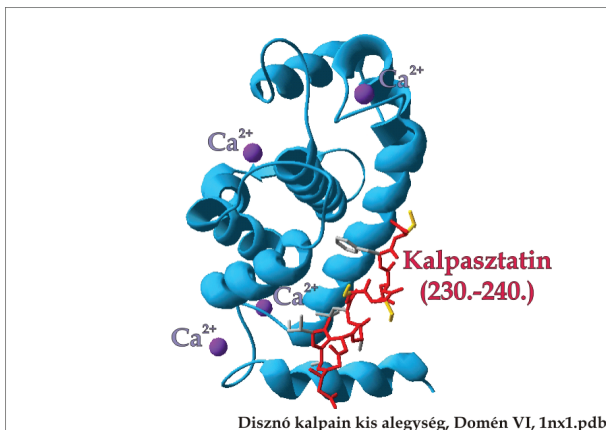
DabcyI-TPLKSPPPSPR- EDANS

9. ábra: A kalpain „szuper szubsztrát”-jának szekvenciája (Banoczi és mts. 2008)

II.3.7. A kalpain természetes inhibitora, a kalpasztatin

A kalpasztatint, a kalpain természetes inhibitorát 1976-ban fedezték fel (Dayton és mts. 1976), m-kalpain izomszövetből való tisztításakor. A kalpasztatin nevet 1979-ben kapta (Murachi 1989). Már korán felfigyeltek különös tulajdonságaira, mint a hőstabilitás és kémiai detergenssekkel szembeni rezisztencia (Geesink és mts. 1998, Otsuka és Goll 1987), melyről ma már tudjuk, hogy rendezetlen szerkezetéből ered (Csizmok és mts. 2005).

Csak egy kalpasztatin gén található a magasabbrendű szervezetekben, mint például az ember esetében is, azonban több splice variáns (8 forma) is kifejeződik erről az egy génről. A képződő termékek méretei 17,5 – 84 kDa között változnak. Ugyanakkor alacsonyabb rendű élőlényekben eddig még nem sikerült a kalpasztatint vagy más homológ fehérjét azonosítani, így nincs ilyen ismert fehérje sem *Drosophilában*, sem *C. elegansban*. A teljes hosszúságú kalpasztatin egy 5 doménből felépülő fehérje, melyben egy L domén és négy gátló domén található. Az L domén egy L-típusú kalciumcsatornához való lokalizációért felelős, mely némely splice variánsban hiányzik. A gátló domének, melyek nagyfokú homológiát mutatnak egymással, egy-egy kalpait képesek megkötni, így egy teljes kalpasztatin négy kalpait képes egyidejűleg gátolni. A gátló domének kalpain gátlási képességei az 1, 3, 2 és 4 sorrendben gyengülnek (Hanna és mts. 2007). Egy gátló doménen belül három felismerőhelyet (A, B, C szubdomént) szokás megkülönböztetni. Az A és a C a kalpainhoz való kötődésért a B pedig annak gátlásáért felelős. Sikeresen megoldották a kalpain VI-os domén és kalpasztatin C peptid komplexének röntgenszerkezetét (Todd és mts. 2003), melyből kiderült, hogy a kalpasztatin C szubdoménje hogyan kötődik a kalpain felszínéhez (10. ábra). A B szubdomén önnállóan is képes a kalpain gátlására (Crawford és mts. 1993), ám nagyon gyengén egy teljes doménhez képest. Ugyanakkor kimutatták, hogy az A és C szubdomének, melyek gátlási tulajdonságokkal nem rendelkeznek, képesek aktiválni a kalpait (Banoczi és mts. 2007) a kalcium-igény csökkentése révén.



10. ábra: Kalpain VI-os domén kalcium-ionokkal és kalpasztatin peptiddel alkotott komplexének röntgenszerkezeti képe

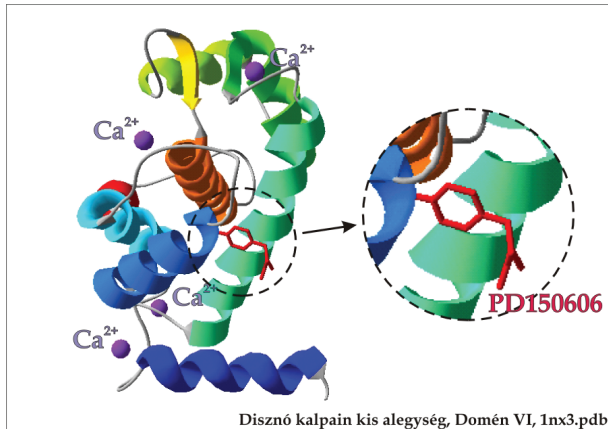
A kalpasztatin az egyetlen ismert fiziológias kalpain inhibitor (Goll és mts. 2003, Wendt és mts. 2004). Az irodalomban leírtak ugyan más inhibitorokat is, mint például a kininogén (Sasaki és mts. 1991), azonban azok lokalizációja különbözik a kalpainétól, míg a kalpain kalpasztatin elhelyezkedés közel azonos. A kalpasztatin valószínűleg nem csak, hogy az egyetlen, hanem nagyon specifikus inhibitor is. Semmilyen más, eddig megvizsgált proteázt (tripszin, kimotripszin, plasmin, trombin, pepszin, katepszin, termolizin, papain, bromelin, fikin) nem gátol (Goll és mts. 2003).

II.3.8. Szintetikus kalpain inhibitorok

A kalpain inhibitor 1 (ALLN) egy aktív helyhez kötődő inhibitor, mely már μM alatti koncentrációban gátolja a kalpait ($pI_{\mu\text{-kalpain}} = 0,086 \mu\text{M}$; $pI_{\text{m-kalpain}} = 0,192 \mu\text{M}$), ugyanakkor nem csak a kalpait gátolja, hanem a katepszineket is.

Specifikusságban egy jobb, a katepszineket nem gátoló, és nem az aktív helyhez kötődő reverzibilis inhibitor a PD150606 (11. ábra). Kicsit rosszabbak a kalpain gátlási képességei ($pI_{\mu\text{-kalpain}} = 0,21 \mu\text{M}$; $pI_{\text{m-kalpain}} = 0,37 \mu\text{M}$), azonban $10 \mu\text{M}$ koncentrációban alkalmazva *in vivo* is (Molt-4 sejteken vizsgálva) képes a kalpainok teljes gátlására (Wang és mts. 1996). A gátlási képessége valószínűleg azon alapszik, hogy a kalmodulinszerű fő kalciumkötő

doménekhez kötődve, megakadályozza a kalcium-ionok hatására bekövetkező konformációs változásokat, illetve a jel terjedését a molekulán belül.



11. ábra: Kalpain VI-os domén kalcium-ionokkal és PD150606 inhibitorral alkotott komplexének röntgenszerkezeti képe

II.4. Fiziológias és patológias funkciók

II.4.1. *In vitro* szubsztrátok

A százat is meghaladja azon fehérjék száma, melyekről legalább *in vitro* körülmények között kimutatták, hogy szubsztrátjai a kalpainnak. Egy népes csoportja ezen fehérjéknek a citoskeletális szubsztrátok. Ide tartozik például a spektrin (Stabach és mts. 1997), a MAP2 (Johnson és Foley 1993), a tau (Litersky és Johnson 1992), a filamin (Kwak és mts. 1993) és a talin (Muguruma és mts. 1995). Egy másik csoport a kinázok és foszfatázok, mint például a CaM kináz II (Hajimohammadreza és mts. 1997), a PKC (Kishimoto és mts. 1989, Yamakawa és mts. 2001) és a miozin könnyű-lánc kináz (MLCK) (Ito és mts. 1987). A szubsztrátok népes csoportját alkotják az integráns membrán fehérjék, receptorok és csatornák. Ilyen például az EGF receptor (Gregoriou és mts. 1994), az AMPA receptor (Bi és mts. 1994), a G-fehérje (α alegysége) (Greenwood és Jope 1994) és az L-típusú kalcium csatorna (Hell és mts. 1996). Számos transzkripciós faktorról is kimutatták, hogy képes a kalpain hasítani, így például a c-Fos (Hirai és mts. 1991), a c-Jun (Hirai és mts. 1991), a PARP (Buki és mts. 1997), a p53 (Zhang és mts. 1997) és a c-Myc (Watt és Molloy 1993).

Ezen kívül még több fehérjéről is megállapították, hogy a kalpain képes a limitált hasításukra, ilyen például a kaszpáz 9 (Chua és mts. 2000), a glikogén szintáz (Hiraga és Tsuiki 1986) vagy a Faktor V (Bradford és mts. 1988).

II.4.2. *In vivo* szubsztrátok

Több esetben kimutatták, hogy az *in vitro* kalpain szubsztrát nem fiziológiás szubsztrátja az enzimnek. Jó példa erre az extracelluláris elhelyezkedésű Faktor V, melyről kimutatták, hogy jó szubsztrátja a kalpainnak (Bradford és mts. 1988), ám ezt lokalizációs vizsgálatokkal *in vivo* nem sikerült még alátámasztani (Goll és mts. 2003). A kalpain kizárólagosan intracelluláris elhelyezkedésű, kivéve különböző sejt sérüléseket, amikor bekerülhet a véráramba, ám az ott található kininogének (Sasaki és mts. 1991, Sasaki és mts. 1991) gátolják a proteolitikusan aktív kalpaint. Mindezek alapján jelenleg nem eldönthető, hogy a Faktor V fiziológiás szubsztrátja-e a kalpainnak.

Annak eldöntésére, hogy egy *in vitro* szubsztrát valódi *in vivo* szubsztrát-e, leggyakrabban ellenanyagokat alkalmaznak. A lehetséges hasított termék N-terminálisát felismerő monoklonális ellenanyag segítségével megállapítható, hogy az adott fragmens megjelenik-e a vizsgálni kívánt szövetben (Martin és mts. 1995, Saido és mts. 1993).

II.4.3. Szubsztrátkeresés *Drosophila*-ban

Az egyik korai munka során, *Drosophila* kalpain szubsztrátokat kerestek muslica pete extraktumban (Amano és mts. 1997). A *Drosophila* petéket frakcionálták, majd rekombinánsan előállított kalpain A-t adtak az eleyhez és SDS-PAGE-n követték, hogy mely fehérjesávok változnak a kalpain hatására. A kontroll kísérletekben E64 irreverzibilis kalpain inhibitor alkalmaztak, majd a feltételezett szubsztrátokat tömegspektrometria segítségével azonosították. Négy kalpain szubsztrátot találtak, ezek közül három riboszómális fehérje (L5, L7, L8), egy pedig az elongációs faktor α -alegysége (EF-1 α) (Amano és mts. 1997).

II.4.4. Betegségek és a kalpain

A kalpainok számos betegség, és azok tüneteinek kialakulásában közvetlen vagy közvetett módon is szerepet játszanak, ezért vizsgálatuk igen indokolt (Suzuki és mts. 2004).

Az Alzheimer-kórban amiloid β -peptidek felhalmozódása és aggregációja intracelluláris kalcium-ion koncentrációnövekedéshez vezet, ami túlaktiválja a kalpaint (Jordan és mts. 1997). Az aktív enzim közvetlenül is, és kaszpázok aktiválása által is, citoskeletális és a citoszolban elhelyezkedő fehérjék bontását idézi elő, ami sejtfunkciós zavarokhoz és

apoptózishoz vezet. Egy másik útvonalon a p35 emésztésével keletkező p25 aktiválja a cdk5-öt, ami a tau fehérje hiperfoszforilációját és aggregációját okozza. (Buee és mts. 2000).

A II-es típusú (nem inzulin-függő) cukorbetegség a világ lakosságának közel 4%-át sújtja. A sejtek rezisztenssé válnak az inzulinra, így a glükóz homeosztázis felborul. Genetikai vizsgálatok egy, a 2-es kromoszómán található egyik kalpain gént, a kalpain 10-et hozták összefüggésbe a betegség kialakulásával (Horikawa és mts. 2000). Feltételezések szerint a kalpain 10-nek az inzulin jelátviteli útvonalban és a glükóz metabolizmusban is szerepe lehet (Cox 2001, Cox és mts. 2004). *In vitro* kísérletekben kimutatták, hogy a kalpain gátlásával inzulin rezisztencia csökkenés érhető el izolált vázizomban (Sreenan és mts. 2001). Valamint, hogy az m-kalpain *in vitro* körülmények között képes a glükóz transzport jelentős részéért felelős GLUT4 receptort hasítani (Otani és mts. 2004). Mindezek ellenére, csak azt állíthatjuk biztosan, hogy a kalpain 10 gén defektusa növeli a cukorbetegség kialakulásának kockázatát (Branca 2004).

A 2A-típusú izomdisztrófia (LGMD2A) egy autoszomális recesszív betegség, melynek kialakulását a kalpain 3-mal (más néven p94-el) hozták összefüggésbe (Bartoli és Richard 2005, Richard és mts. 1995). A kalpain 3 egy vázizom specifikus kalpain forma, amely a titin fehérje connectin régiójához kötődik az N2-, az M- és a Z-vonalaknál, és nélkülözhetetlen a normális izomsejt fejlődéshez (Sorimachi és mts. 1995, Spencer és mts. 2002). A titin és más titinhez asszociált fehérje hasítása és a jelátvitel szabályozása az enzim fő feladata. Pont mutációt hordozó betegek adatainak elemzése alapján arra a megállapításra jutottak, hogy a kalpain 3 funkcionális, és nem szerkezeti hibája okozza a betegséget (Ono és mts. 1998).

A kalpain onkogén és tumorszuppresszor fehérjeszubsztrátjai is ismertek (ras, c-fos, c-jun, p53, merlin), így nem meglepő, hogy rákos elváltozások kialakulása is köthető a kalpain rendszerhez (Suzuki és mts. 2004). Egyes bélrákokat az emésztőrendszerben specifikus kalpain 9-el (nCl-4) hozták összefüggésbe. Azt találták, hogy ezekben a rákos sejtekben igen alacsony a kalpain 9 szintje (Yoshikawa és mts. 2000), ami így nem képes feladatát ellátni.

II.5. Kétdimenziós gélelektroforézis

Napjaink egyik, a proteomikai kutatások előretörésével a középpontba kerülő, nagy felbontású elválasztás technikája a kétdimenziós gélelektroforézis. Első leírása óta (Gorg és mts. 1988) számos módosítás és új eljárás is megjelent (Gorg és mts. 2000), de a hagyományos kétdimenziós elektroforézis lényege változatlan, vagyis első dimenzióban a fehérjéket izoelektromos pontjuk, a második dimenzióban pedig molekulatömegük szerint választjuk szét.

A két elektroforetikus technikát kombinálva egy nagy felbontóképességű fehérje expressziós mintázatok összehasonlítására, lokalizációs vizsgálatokra, és egyéb fontos molekuláris biológiai kutatásra lehet használni (Lilley és mts. 2002).

A kétdimenziós gélelektroforézis használhatóságát több tényező is befolyásolja. Probléma lehet a reprodukálhatósággal, a felbontóképességgel, azokkal a fehérjékkel, melyek extrém izoelektromos ponttal rendelkeznek, a nagyon hidrofób fehérjékkel, mint például a membránfehérjék, a nagyon nagy molekulatömegű fehérjékkel és azokkal, melyek alulreprezentáltak a mintában. Egy tipikus, nagyméretű 2D-s gélen körülbelül 1-2000 fehérjefoltot lehet megbízhatóan megkülönböztetni, mely egy átlagos organizmus génjeinek (10-20000) maximum 10%-a (Miklos és Maleszka 2001, Zuo és mts. 2001). Ahhoz, hogy detektálható legyen egy fehérje, a sejteknek minimum 1000 kópiát kell tartalmazniuk belőle (Gygi és mts. 2000). Az is rontja a felbontóképességet, hogy vannak fehérjék, melyeknek megegyezik az izoelektromos pontjuk és a méretük is, azaz ezzel a technikával nem választhatóak szét. Ennek kiküszöbölésére, számos eljárást kidolgoztak. Ezek mindegyikében egy előfrakcionálás lépést iktatnak be, ami még egy tulajdonság alapján szétválasztja a mintában található fehérjéket. Ilyen eljárás például egy ioncserélő kromatográfia (Butt és mts. 2001), vagy egy sűrűség centrifugálás (Hanson és mts. 2001), vagy egy hidrofób-kölcsönhatáson alapuló kromatográfias lépés (Stevanovic és Bohley 2001).

A fehérjék gélen való detektálására több festési eljárás is létezik. A hagyományos Coomassie festésnél, a széles körben használt ezüsfestés érzékenyebb, ám a kvantitatív analízisre alkalmatlanok az ezüst-festett gélek. A probléma kiküszöbölésére különböző fluoreszcens festési eljárásokat dolgoztak ki, mint például a Sypro (Yan és mts. 2000), mely jóval érzékenyebb, mint a Coomassie. Egy másik ilyen napjainkban egyre népszerűbb eljárás a DIGE (differenciáló gélelektroforézis) (Unlu és mts. 1997), melynek lényege, hogy két összehasonlítani kívánt mintát, még a futtatás előtt kétféle fluoreszcens festékekkel megfestenek, majd összekeverik a mintákat, és együtt futtatják. Így a gél egyenletlenségéből származó futási rendellenességek mindkét mintában azonos módon jelentkeznek. A kétfajta festék segítségével megkülönböztethető, hogy melyik fehérje, melyik mintából származik. A módszer érzékeny, már 200 pg-os fehérjemennyiség is detektálható.

III. Célkitűzések

Nem ismert olyan röntgenszerkezet, melyben egy teljes hosszúságú kalpainat kalcium ionok jelenlétében kristályosították, így nem tisztázott, hogy milyen molekuláris átrendeződések zajlanak le az enzim aktiválódása során.

Az inaktív kalpain proenzimben a katalitikus aminosavak egymástól távol helyezkednek el, így a II-es domén egy kifeszített konformációban rögzül. Ezt a nyitott állapotot többek között a III-as doménben található savas aminosavakban gazdag hurok régió sóhidakon keresztül stabilizálja, ezért célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk a hurok régió szerepét az enzim aktiválódása során.

Az a tény, hogy a fő, kalcium kötésért felelős domének a molekula ellentétes oldalán helyezkednek el, a katalitikus centrumhoz képest, azt valószínűsíti, hogy az kalcium-ion által okozott kis konformációs változásnak a molekula egészén végig kell terjednie. Az egyik ilyen lehetséges útvonal a III-as és IV-es domént összekötő ún. transzducer szekvencia, ami egy 20 aminosavból álló nyújtott konformációjú peptidlánc. Célul tűztük ki, hogy irányított mutagenézis segítségével feltérképezzük ezen szakasz szerepét a konformációs változás tovaterjedésében.

A kalpain molekuláris megismerése mellett egy másik igen fontos és eddig még nem megfelelően feltárt terület a kalpainok sejten belüli funkciója. Szabályozó proteáz révén számos intracelluláris folyamatban fejt ki hatását, melyeknek pontos megismerése nélkülözhetetlen a betegségekkel szemben vívott küzdelemhez. Ezeknek a folyamatoknak a felderítésében az egyik kulcskérdés, hogy mely fehérjék működését szabályozza közvetlenül a kalpain, azaz, melyek a szubsztrátjai. Számos fehérjéről kimutatták már, hogy *in vitro* körülmények között a kalpain képes a hasításukra, ám eddig csak kevésről igazolták, hogy a fehérjebontás *in vivo* is lezajlik. Ezért célul tűztük ki, hogy megalkotunk egy *in vivo* kalpain szubsztrátok keresére alkalmas technikát.

IV. Anyagok és módszerek

IV.1. „Extended transducer” modell

IV.1.1. Mutánsok előállítás

IV.1.1.1. A kalpain B és az m-kalpain konstrukció

A kalpain B gént kódoló cDNS-t LD16770 szekvenáló vektorból amplifikáltuk pfu turbo (Stratagen) polimeráz, valamint

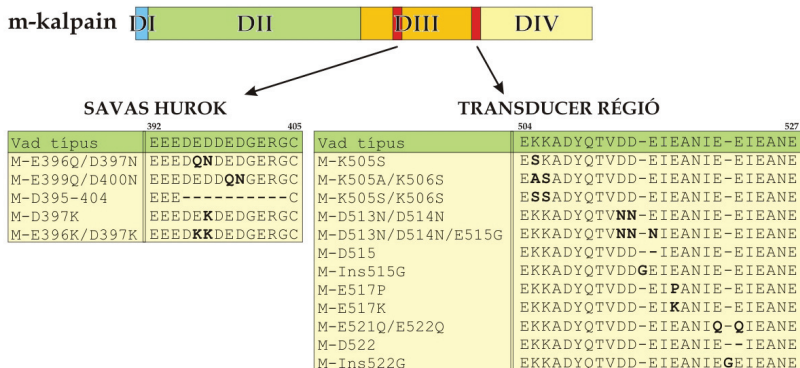
5'-CTAGCTAGCATGTACGGCATTGATAATTACCCC-3' és

5'-CCGCTCGAGAGAGTAAATTGTTTCGCTCCAG-3' primerek segítségével. A PCR terméket ezután NdeI és XhoI restikciós endonukleázokkal emésztettük, majd pET21c(+) expressziós vektorba klónoztuk oly formán, hogy a kifejeződő fehérje C-terminálisán egy 6 hisztidinből álló tag legyen a stop kodon előtt. A kialakított konstrukciót T7 primerrel történő szekvenálással ellenőriztük.

Mind az m-kalpain gén nagyalegységét kódoló pET24b, mind a kisalegység C-terminális 184 aminosavat kódoló pACpET vektorokat Prof. J. S. Elce bocsátotta rendelkezésünkre (Queen's University, Kingston, Ontario, Kanada) (Elce és mts. 1995). A fehérjetisztítást elősegítendő a nagy alegység C-terminálisán, a kalpain B-hez hasonlóan, egy hat hisztidinből álló tag található a stop kodon előtt.

IV.1.1.2. Irányított mutagenézis

A mutációkat (12. ábra) QuikChange mutagenézis kit (Stratagene) segítségével alakítottuk ki. Ehhez templát DNS-ként a fentebb említett kalpain B és m-kalpain plazmidokat használtuk. A reverz primerek minden esetben a forward primerek (1. Táblázat) reverz komplementer szekvenciái voltak. A mutációs helyek környékét szekvenálással ellenőriztük.



12. ábra: A patkány m-kalpainon kialakított mutációk

A mutáció neve	Forward primer szekvencia
B-D613N/D614N	5' -CGCTGGAGGATCCCAACAACGAGGATGACGATGGC-3'
B-D617N/D618N	5' -CCCAGCAGCAGGATAACAATGGCAAATGCACGGC-3'
B-Δ613-620	5' -GGGCCACAATAGCCGTGCAAGCATCTCCAGCGAAATGATG-3'
M-E396Q/D397N	5' -GCTGGAGGAAGAAGATCAAAATGATGAGGATGGGGAGAG-3'
M-E399Q/D400N	5' -GGAAGAAGATGAAGATGATCAGAATGGGGAGAGGGGC-3'
M-Δ395-404	5' -CCTAATCAAGCTGGAGGAAGAATGTACTTCTCGTGGG-3'
M-D397K	5' -GCTGGAGGAAGAAGATGAAAAGGATGAGGATGGGGAGAGG-3'
M-E396K/D397K	5' -GCTGGAGGAAGAAGATAAAAAGGATGAGGATGGGGAGAGGG-3'
M-Δ515	5' -CCAAACTGTCGATGATATCGAGGCCAACATTG-3'
M-Ins515G	5' -CCAAACTGTCGATGGCGATGAATCGAGGCC-3'
M-E517P	5' -CCAAACTGTCGATGATGAAATCCCGGCCAACATTGAAGAG-3'
M-E517K	5' -CCAAACTGTCGATGATGAAATCAAGGCCAACATTGAAGAG-3'
M-Δ522	5' -CGAGGCCAACATTGAAATGAAGCCAATGAGG-3'
M-Ins522G	5' -CGAGGCCAACATTGAAGGCCAGATTGAAGCCAATG-3'
M-K505S	5' -CCGAGTCTTCTCAGAGAGCAAGGCTGACTACCAAC-3'
M-K505A/K506S	5' -CCGAGTCTTCTCAGAGGCCAGCGCTGACTACCAACTGTGCG-3'
M-K505S/K506S	5' -GCATCCGAGTCTTCTCAGAGAGCAGCGCTGACTACCAACTGTGCGATG-3'
M-D513N/D514N	5' -GGCTGACTACCAACTGTCAATAATGAAATCGAGGCCAACATTG-3'
M-D513G/D514G/E515G	5' -GCTGACTACCAACTGTCCGTGGTGGCATCGAGGCCAACATTG-3'
M-E521Q/E522Q	5' -GAAATCGAGGCCAACATTCAACAGATTGAAGCCAATGAGGAGG-3'

1. Táblázat: Az előállított mutációk és a mutagenézisekhez használt forward primerek szekvenciái

IV.1.2. Fehérje kifejeztetés és tisztítás

Az expressziós vektorokat standard eljárásokkal *E. coli* BL21 (DE3) sejtekbe transzformáltuk. A sejteket ezután NZYM tápoldatban (1% N-Z-Case Plus; 0,5% select yeast extract; 0,5% NaCl; 0,2% MgCl₂) antibiotikumok (kalpain B esetén: 100 µg/ml ampicillin; m-kalpain esetében: 100 µg/ml ampicillin és 20 µg/ml kanamicin) jelenlétében növesztettük 37 °C-on, 250 rpm-es rázatás mellett 0,6-0,8-as abszorbanancia eléréséig (A₆₀₀).

A kalpain B-t citoszolból és inklúziós testekből is preparáltuk. A citoszolból való preparálásához az expressziós vektorokat tartalmazó sejteket 0,5 mM IPTG-vel 20 °C 3 órán keresztül indukáltuk, majd a sejt kultúra jégén való hűtése után a sejteket centrifugálással gyűjtöttük össze (3000 x g; 20 perc; 4 °C). A lízis pufferben (50 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ pH 7,50; 300 mM NaCl; 1 mM EDTA; 5 mM benzamidin; 1 mM PMSF) való felfuszpendálást követően a feltáráshoz a mintát szonikáltuk (6 x 10 sec; 16 mikron; 0 °C), majd ultracentrifugálással (100000 x g; 60 min; 4 °C) megszabadultunk a sejt nem oldódó komponenseitől. A felülúszó frakciót ezek után egy 5 ml térfogatú előzetesen ekvilibrált Ni-NTA oszlopra (Qiagen) vittük (ekvilibráló puffer megegyezik a lízis pufferrel, azzal a különbséggel, hogy nem tartalmaz EDTA-t). Az oszlopot mostuk (50 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ pH 7,50; 300 mM NaCl; 5 mM benzamidin; 1 mM PMSF; 2% glicerin; 1% tween 20; 10 mM imidazol), majd a fehérjét az oszlopról lineáris imidazol gradiens segítségével eluáltuk (20-tól 250 mM imidazol tartalmazó EDTA nélküli lízis puffer). A fehérjét ezek után átdializáltuk (50 mM TRIS pH 7,50; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM benzamidin; 0,25 mM PMSF; 10 mM β-merkaptotanol) és felhasználásig 4 °C-on tároltuk. Kalpain B-t inklúziós testekből is preparáltunk Jekely és Friedrich módszere szerint (Jekely és Friedrich 1999). Ezekben az esetekben, 0,5 mM IPTG mellett 30 °C-on 3 órán keresztül zajlott az indukció. Az így előállított enzim tulajdonságai megegyeztek a citoszolból preparált kalpain B tulajdonságaival.

Az m-kalpain esetében a sejtek fehérjetermelését 0,4 mM IPTG-vel indukáltuk 30 °C-on, 3 órán keresztül, majd a sejt kultúra lehűtése után a sejteket centrifugálással gyűjtöttük össze (3000 x g; 20 perc; 4 °C). A sejteket lízis pufferben felfuszpendáltuk, majd szonikálással feltártuk. A sejt oldhatatlan részeitől ultracentrifugálással (100000 x g; 60 perc; 4 °C) szabadultunk meg. A felülúszót 5 ml NiNTA oszlopra (Qiagen) vittük, ahol mosást követően 250 mM imidazol tartalmazó pufferrel eluáltuk. A preparálás során használt pufferek összetétele megegyezik a kalpain B esetében ismertettekkel.

Az így előállított kalpain B és m-kalpain vad típus, valamint mutánsaik a preparálás után megfelelően tisztának bizonyultak a kinetikai vizsgálatok elvégzésére, melyről 10%-os SDS-PAGE-en való futtatással győződünk meg.

IV.1.3. Fluorimetriás aktivitásmérés

A kalpain aktivitást egy Jasco FP 777 spektrofluoriméteren mértük, időben követve a szubsztrát (N-succinyl-Leu-Tyr-7-amino-4-methyl-coumarin (Sigma)) bontásából származó fluoreszcencia növekedést 380 nm-es besugárzási és 460 nm-es detektálási hullámhosszon. A kinetikai mérések 50 µl-es végtérfogatban szobahőmérsékleten történtek (50 mM TRIS-HCl pH 7,50; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM DTE), ahol a szubsztrát koncentráció 1 mM volt. A reakciót minden esetben a kalpain hozzáadásával indítottuk, melyet előzetesen 2 mM β-merkaptotetanollal 20 percig inkubáltunk, hogy az enzim molekulák aktív ciszteinjei redukált formában legyenek. A szabad kalcium koncentrációt egy hagyományos kalcium szenzitív elektróddal mértük meg.

A kalpain B és az m-kalpain is egy allosztérikusan gátolt enzim, így az aktivitásgörbéjük egy lag fázissal indul, mely az aktiválódásnak felel meg, majd az enzimaktivitás eléri a maximális sebességet, amely azután a lassú inaktiválódás miatt letörik. A maximális aktivitásokat az aktivitásgörbe első deriváltjának szélsőértékéből állapítottuk meg. A specifikus aktivitásokat az 5 mM szabad kalcium koncentrációhoz tartozó aktivitásokból számoltuk, melyhez az enzimkoncentrációkat Bradford-féle módszerrel (Bradford 1976) határoztuk meg. Csak frissen preparált enzimet használtunk, a specifikus aktivitások megállapítása a preparálást követő napon történt, miután a mintát egy éjszakán keresztül dializáltuk 1 mM EDTA jelenlétében (50 mM TRIS-HCl pH 7,50; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 5 mM BA; 0,5 mM PMSF; 10 mM β-ME). A dialízist követően az esetleges denaturált és aggregált fehérjéktől ultracentrifugálással szabadultunk meg (100000 x g; 30 perc; 4 °C), majd a preparátum homogenitásáról SDS-PAGE-n történő futtatással is meggyőződünk.

IV.2. Kalpain szubsztrát keresés

IV.2.1. *Drosophila* sejt kultúra fenntartás

A kísérleteinkhez használt *Drosophila* Schneider S2 sejteket (Invitrogen) szérumentes rovar tápoldatban tartottunk (Sigma: Serum-free Insect Medium-1), melyet előzetesen L-glutaminnal (Sigma) komplementáltunk. A sejtek védelméről penicillin-sztreptomycin (Gibco: 50 µg/ml) oldattal gondoskodtunk.

IV.2.2. Endogén kalpain formák immunológiai detektálása

IV.2.2.1. Western-blot analízis

Az S2 sejteket 1500 x g, 5 perc, 4 °C-os centrifugálással összegyűjtöttük, majd 50 mM TRIS-HCl pH 7,50; 250 mM szacharóz pufferben mostuk. A felszuszpendált sejteket, újabb centrifugálással gyűjtöttük össze (1500 x g, 5 perc, 4°C), majd lízis pufferben (30 mM TRIS-HCl pH 6,8; 10% glicerin; 3% SDS; 0,006% brómfenolkék) szuszpendáltuk fel őket, mely egyúttal a SDS-PAGE mintakóttól is volt. A sejtek nem oldható részeitől ultracentrifugálással (100000 x g; 15 perc; 4 °C) szabadultunk meg. A immunoblottot Towbin és mts. (Towbin és mts. 1979) szerint végeztük, poliklonális kalpain A és kalpain B elsődleges ellenanyagot használva.

IV.2.2.2. Kalpain festés sejten belül

A sejteket először PBS-sel mostuk, majd 3%-os paraformaldehiddel fixáltuk 10 percen keresztül. A 0,1%-os Triton-X 100-as permeabilizálás után a blokkolást 1%-os BSA oldattal végeztük harminc percen keresztül, majd szintén harminc percig voltak a sejtek az elsődleges ellenanyagban (kalpain A és kalpain B ellenanyag 1000x hígításban használtuk 1%-os BSA oldatban). Ezt egy 2 órás PBS-es mosás követte, mely során háromszor cseréltük a mosó oldatot. A másodlagos ellenanyagban is 2 órát álltak a sejtek (Rhodamine RedTM-X (Molecular Probes)). A felesleges ellenanyagot 2 órás PBS-es mosással távolítottuk el. MOWIOL 4-88 ragasztóanyagot használtunk a tárgylemezhez ragasztáshoz, majd egy Leica DMLS fluorescens mikroszkópot és egy Spot RT színes digitális kamerát alkalmaztunk a felvételek elkészítéséhez (Diagnostic Instruments).

IV.2.3. Kalpain aktivitásmérés

A *Drosophila* S2 sejtekből való kalpain aktivitásmérésekhez $1-1,5 \times 10^7$ sejtet centrifugálással gyűjtöttünk össze (1500 x g; 5 perc; 4 °C), majd PBS-sel háromszor mostuk. Az összegyűjtött sejteket 300 µl lízis pufferben szuszpendáltuk fel (50 mM TRIS-HCl pH 7,40; 150 mM NaCl; 10 mM EDTA; 10 mM β-merkaptotanol; 10 mM benzamidin; 1 mM fenilmetilszulfonil-fluorid), majd a jobb feltárás érdekében szonikáltuk (4 x 16 mikron; 10 sec). A sejtextraktumot ultracentrifugáltuk (100000 x g; 20 perc; 4 °C) és az aktivitásméréseket a felülúszóból végeztük.

Módosított FRET szubsztrát (Tompa és mts. 2004) segítségével egy FP spektrofluoriméteren (Jasco) végeztük a méréseket, 320 nm gerjesztési és 480 nm detektálási hullámhosszon. 50 µl-es végtérfogatban dolgoztunk, melyben 25 µl sejt kivonatot tartalmazott (50 mM TRIS-HCl; pH 7,40; 150 mM NaCl). A kísérletek során a minta 5 mM EDTA-t vagy 15 mM szabad kalciumot tartalmazott, illetve az inhibitoros mérések során 20 µM kalpain inhibitor I (CI-I) is volt a reakcióelegyben.

IV.2.4. 2D gélelektroforézis

Három különböző módon kezelt mintát vizsgáltunk. A kontroll mintában a sejtekhez nem adtunk semmit. Az aktivált mintában a tápoldat 10 µM ionomicint és 10 mM CaCl₂ tartalmazott. Az inhibitoros minta 10 µM ionomicin és 10 mM CaCl₂ mellett 10 µM PD150606 kalpain inhibitor (Wang és mts. 1996) tartalmazott. 60 perces inkubálást követően, a sejteket összegyűjtöttük, jégen hűtöttük, majd 3 ml mosó pufferben mostuk (10 mM TRIS-HCl pH 7,50; 250 mM szacharóz), hogy megszabaduljunk a médiumtól, ami nem kívánt vezetőképességet okozott volna. A sejteket centrifugálással gyűjtöttük össze (1500 x g; 4 perc; 4 °C), majd felsuszpendáltuk egy ún. rehidratációs pufferben (8 M urea; 0,2 % BioLyte 3-10 amfolit (BioRad); 2 % CHAPS; 10 mM DTE; 0,001% brómfenolkék). A sejtet biztos feltárása érdekében a sejtuszpenziót szonikáltuk (5 x 16 mikron; 10 sec; 0 °C), majd ultracentrifugáltuk (100000 x g; 20 perc; 4 °C). A rehidratációs tálcára minden esetben 200 µl felülúszót helyeztünk, ahol az IPG strip-eket (BioRad pH 3-10) 60 percen keresztül rehidratáltuk. A strip-eket a fókuszáló tálcára helyeztük, majd az izoelektromos fókuszálást két lépésben végeztük (1. lépés: 2000V x 3 mA x 3 W x 20 min; 2. lépés: 4000 V x 2 mA x 2 W x 2 óra; Σ = 8600 V-hr). A második dimenzió futtatása előtt az IPG strip-eket több lépésben SDS tartalmú pufferrel itattuk át, minden lépésnél 10 percig áztatva az IPG strip-et (ekvilibráló puffer I: 6 M urea; 50 mM TRIS-HCl pH 8,8; 2% SDS; 20% glicerin; 2% DTE;.

ekvilibráló puffer II: 6 M urea; 50 mM TRIS-HCl pH 8,8; 2% SDS; 20% glicerin; 2,5% jódiacetamid; ekvilibráló puffer III: SDS-PAGE futtató puffer + 0,001% brómfenolkék). Az áztatás után az IPG strip-et 4%-os felső gélbe polimerizáltuk, és a második dimenzióban a fehérjéket egy 10%-os gélen választottuk szét (200 V x 200 mA x 200 W x 50 min). A geleket Coomassie Brilliant Blue R250-es festékkel festettük meg (Serva).

IV.2.5. 2D gél kiértékelés

A megfuttatott és megfestett geleket 600 dpi-s felbontásban beszkeneltük, majd a képek háttérét levontuk Gustafsson és mts. szerint (Gustafsson és mts. 2002). A folt intenzitásokat PDQuest 2-D analízáló programmal (BioRad) értékeltük ki. Ahhoz, hogy a festődésből származó különbségeket kiküszöböljük, normalizáltuk az intenzitás értékeket az adott gél átlagos foltintenzitására, majd az összetartozó gelek azonos foltjainak intenzitását átlagoltuk. Csak azokat a foltokat fogadtuk el, melyek intenzitásának szórása a 90% konfidencia intervallumon belül esett.

IV.2.6. Tömegspektrometriás azonosítás

A lehetséges kalpain szubsztrátként azonosított foltokat steril gélen történő futtatás után sterilen kivágtuk, majd tömegspektrometriás analízisre a szegedi Proteomikai laborba küldtük. A gélmintákat tripszines emésztésnek vettették alá, majd a peptid fragmenseket egy LC-MS/MS segítségével azonosították.

IV.2.7. Szubsztrát fehérjék rekombináns előállítás

A lehetséges kalpain szubsztrátok ellenőrzését négy kiválasztott fehérjén végeztük. Ezek közül az egyiket, a dUTPáz (10) Dr. Vértessy Beáta bocsájtotta rendelkezésünkre. A további három gént, egy aldo-keto redukáz (4), egy glutation S-transzferáz (8) és egy p23 co-chaperont (9) pedig *Drosophila* S2 sejtekből származó cDNS-ből pET-20b(+) (Novagen) expressziós vektorba klónoztuk. A fehérjéket *E. coli* BL21(DE3) sejtekben fejeztettük ki 3 óráig, 37 °C-os 0,1 mM IPTG –vel történő indukció segítségével, majd a feltárást követően a fehérjéket Ni-NTA (Qiagen) affinitás oszlopon tisztítottuk. Ezeket a munkákat kollégám, Alexa Anita végezte.

IV.2.8. *In vitro* emésztési kísérletek

A rekombinánsan előállított fehérjék emésztését *Drosophila* kalpain B-vel és patkány m-kalpainnal is elvégeztük. A reakcióelegy (50 mM TRIS-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 5 mM BA; 0,5 mM PMSF; 10 mM β -merkaptóetanol) a vizsgálni kívánt fehérjéből 0,3 mg·ml⁻¹ koncentrációt tartalmazott, még az emésztőenzim koncentráció 0,02 mg·ml⁻¹ volt, mind a kalpain B-vel, mind az m-kalpainnal végzett emésztések esetén. A két enzim eltérő kalcium igénye miatt 5 mM, illetve 20 mM szabad kalcium-ion koncentrációt alkalmaztunk. A reakciókat 25 mM EDTA és SDS mintakóttól hozzáadásával állítottuk le, majd a mintákat 12,5% SDS poliakrilamid gélen futtattuk meg.

IV.3. Vegyszerek

A kísérletekhez többségéhez Sigma vegyszereket használtunk, amennyiben nem, azt a megfelelő helyen jeleztem. A restrikciós endonukleázok, valamint a protein- és DNS markerek a New England Biolabs (Beverly, MA, USA)-tól származnak, míg a plazmid tisztító kitéket a Macherey-Nagel-től (Németország) vásároltuk. A mutánsok kialakítását a Stratagene (La Jolla, CA, USA) Quikchange irányított mutagenézis kittel végeztük, melyeknek szekvenálással való ellenőrzése az MWG Biotech AG (Ebersberg, Németország) laborjaiban történt. A fehérje előállításához használt *E. Coli* BL21(DE3) sejtvonalat a Novagen-től (Medison, WI, USA) vásároltuk.

V. Eredmények és értékelésük

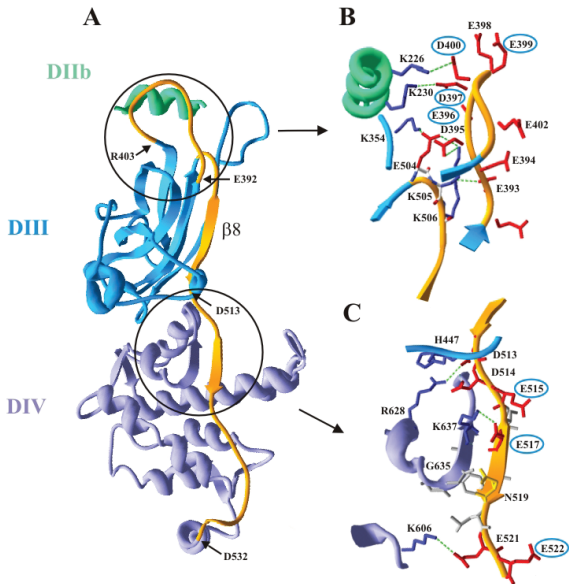
V.1. Savas hurok és az „Extended transducer” modell

V.1.1. Savas hurok mutánsok

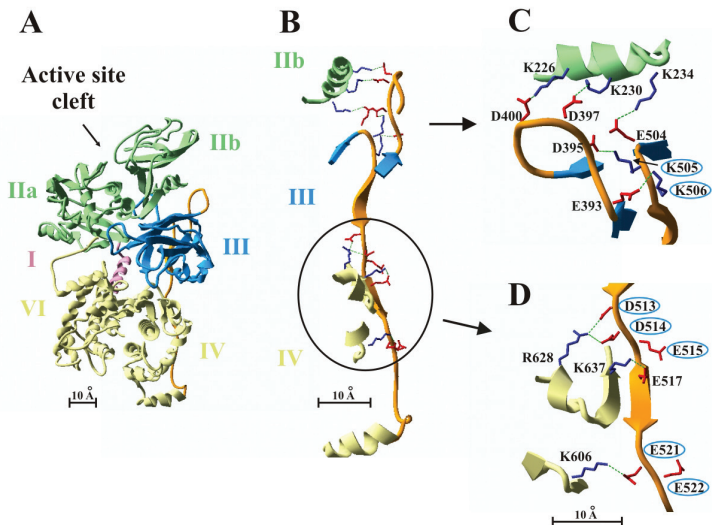
A kalpain III-as domén savas hurok régiójának vizsgálatakor arra voltunk kíváncsiak, hogy befolyásolható-e az aktiválódáshoz szükséges kalcium-ion koncentráció a hurokban található egyes aminosavak szelektív lecserélésével. Csoportunk korábbi munkáiból ismert, hogy a C2 doménszerű III-as domén képes a kalcium-ionok szelektív megkötésére és a doménen belül ez a savas aminosavakban gazdag hurok régió felelős az ionkötésért. A mutációs helyeket az ismert kalpain röntgenszerkezetek alapján terveztük meg. Ezek alapján öt sóhid rögzíti a savas hurok környezetének szerkezetét. Az m-kalpainban ezek az E393-K506, D395-K505, D397-K230, D400-K226 és E504-K234. A K234, K230, K226 a katalitikus doménben találhatóak, az E393, D395, D397, D400 a savas hurok régiót alkotó aminosavak, az E504, K505 és K506 pedig közvetlenül a transducer lánc N-terminális előtt helyezkedik el.

Két kalpainon, a patkány m-kalpainon és a *Drosophila* kalpain B-n végeztük mutációs vizsgálatainkat. Három különböző típusú mutációt alakítottunk ki a savas hurok régióban (13. ábra). Egyrészt a savas aminosavakat neutrálisra cseréltük, hogy ezzel mind a sóhidak kialakulását, mind a kalciumkötést meggátoljuk. Másrészt a savas aminosavakat bázikusra cseréltük, hogy még drasztikusabb hatást érjünk el. Harmadrészt, pedig deléciós mutánst készítettünk, mellyel a teljes hurok régiót töröltük, megszüntetve minden lehetséges kölcsönhatást.

Egy komplementer munkában a savas hurok régióval sóhidakat kialakító katalitikus doménben található lizineket cserélték le egyesével szisztematikusan (Hosfield és mts. 2001). Azt találták, hogy a 226-os és 230-as lizin lecserélése nem befolyásolja jelentősen sem a specifikus aktivitást, sem a kalcium félértéket, azonban a 234-es lizin cseréje, mintegy 30-35%-kal csökkenti az aktivitáshoz szükséges kalcium-ion koncentrációt a vad típushoz képest (Hosfield és mts. 2001).



13. ábra: A patkány m-kalpain röntgenszerkezetének (1kfu) részlete (A), illetve a savas hurok (B) és a transducer lánc (C) kinagyított környezete. A kék karikák a mutációk által érintett aminosavakat jelzik.



14. ábra: A patkány m-kalpain röntgenszerkezeti képe (A), a savas hurok és a transducer lánc (B), valamint a savas hurok(C) és a transducer régió (D) kinagyított környéke. A kék karikák a mutációk által érintett aminosavakat jelölik.

V.1.2. Transducer mutánsok

A transducer lánc vizsgálatakor arra a kérdésre kerestük a választ, hogy szerepe van-e ennek hosszú, nyújtott láncnak a kalcium hatására bekövetkező változás katalitikus centrumhoz való közvetítésében. A transducer, mint fogalom a kalpain röntgenszerkezetek megoldása után keletkezett az m-kalpain 513-532 közötti 20 aminosavas majdnem lineáris felépítésű domének közötti szerkezet megnevezéseként (Hosfield és mts. 1999). Az N-terminális irányban, a III-as doménben egészen a savas hurokig folytatódik ez a nyújtott konformáció (a doménen belül β -redő szerkezetben), mellyel sóhidakat is kialakít (E393-K506, D395-K505). C-terminális irányban pedig egy α -hélixben folytatódik a lánc, mely már a IV-es doménhez tartozik és része az első EF-hand motívumnak. A 20 aminosavas peptidszakaszon két rögzítési pont található. Egyrészt az E521-K606 között kialakuló sóhid, másrészt az 517-519 aminosavak alkotta β -lemez korlátozza a lánc mozgását.

Irányított mutagenézis vizsgálatainkat patkány m-kalpainon végeztük. Négy funkcionálisan fontos régiót választottunk ki a transducer láncon (13. és 14. ábra). Az első régióban a savas hurokkal kölcsönható lizinet cseréltük le alaninra illetve szerinre, hogy

feltérképezzük a transducer és a savas hurok régió közötti sóhidak szerepét az aktiválódásban. A második csoportba azok a mutációk tartoznak, melyek a transducer lánc III-as doménből való kilépése (D513) és a 517-519 β -peptid közötti aminosavakat érintették. Aminosavak lecserélésével, kivágásával, illetve új aminosav beillesztésével arra voltunk kíváncsiak, hogy a lánchossz befolyásolja-e az aktiválódást. A harmadik típusba a rögzítő β -peptidet érintő mutációk tartoznak, melyektől a kölcsönhatások gyengülését vagy teljes elromlását vártuk. A negyedik csoportba pedig a β -peptid és a transducer C-terminálisa közötti régiót érintő változtatások tartoznak, amik az E521-K606-os kölcsönhatás elrontására irányultak, illetve a lánccsökkentését vagy nyúlását idézték elő.

Egy korábbi munkában a transducer lánccsökkentés és a savas hurok közötti sóhidak előtti glutaminsav (E504) szerepét vizsgálták (Hosfield és mts. 2001), mely közvetlenül a katalitikus doménnel lép kölcsönhatásba. A glutaminsav szerinre cserélése közel felére csökkentette az aktiválódáshoz szükséges kalcium-ionok mennyiségét, miközben a specifikus aktivitás gyakorlatilag nem változott (Hosfield és mts. 2001).

V.1.3. Aktivitásmérések

A mutánsokat kifejeztettük, majd mindegyik fehérje esetében felvettük az aktivitásgörbét különböző kalcium-ion koncentráció mellett, melyből kiszámoltuk az aktiválódáshoz szükséges kalcium félértéket, illetve a relatív specifikus aktivitást, ahol kontrollként a vad típusú, mutációt nem hordozó kalpain B-t és m-kalpaint használtuk (2. Táblázat).

A mutáció neve	$[Ca^{2+}]_{1/2}$	Relatív specifikus aktivitás (%)
Kalpain B vad típus	8600 ± 800	100
B-D613N/D614N	1300 ± 200	144
B-D617N/D618N	9900 ± 500	66
B- Δ 613-620		
m-kalpain vad típus	240 ± 30	100
M-E396Q/D397N	7 ± 3	95
M-E399Q/D400N	150 ± 20	23
M- Δ 395-404	440 ± 26	90
M-D397K	100 ± 30	10
M-E396K/D397K	160 ± 13	5
M- Δ 515	67 ± 13	67

M-Ins515G	150 ± 10	57
M-E517P	100 ± 30	43
M-E517K	160 ± 7	55
M-Δ522	210 ± 30	103
M-Ins522G	240 ± 40	70
M-K505S	320 ± 15	147
M-K505A/K506S	340 ± 26	75
M-K505S/K506S	370 ± 11	24
M-D513N/D514N	150 ± 20	143
M-D513G/D514G/E515G	180 ± 18	149
M-E521Q/E522Q	158 ± 10	80

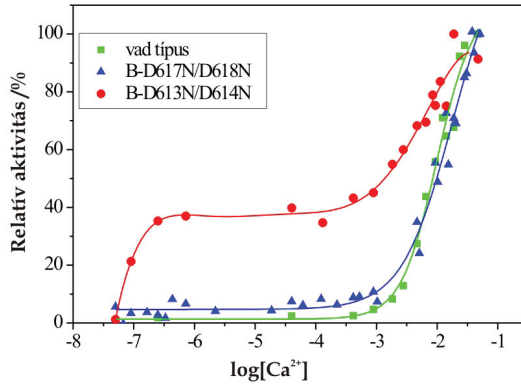
2. Táblázat: A mutánsok jellemzése. A táblázat a létrehozott mutáns azonosítóját, kalcium félértékét, valamint a relatív specifikus aktivitását tartalmazza (a 100% a vad típus specifikus aktivitásának felel meg).

Az első lépésben a savas hurok régió savas aminosavait cseréltük le párosával neutrálisra. Két fontosabb kölcsönhatás megszüntetése volt a cél, egyrészt a D397-K230, másrészt az E400-K226 között kialakuló sóhíd. Az aminosavakat párosával cseréltük le, mert azt feltételeztük, hogy az egyszeres csere esetén egy szomszédos savas aminosav átvenné a lecserélt aminosav kölcsönhatásban betöltött szerepét. A mutációk mindkét esetben szignifikánsan lecsökkentik az enzim aktiválódáshoz szükséges kalcium-ion koncentrációt, azaz a sóhíd elrontása elősegítette az aktiválódást. Ezeket a változtatásokat az m-kalpainon és a kalpain B-n is elvégeztük, és az eredmények mindkét esetben egybehangzóak voltak (15. ábra és 16. ábra). A M-E396Q/D397N mutáció volt nagyobb hatással a kalciumfüggésre, így a második lépésben, a savas aminosavak bázikusra cserélésekor, csak a 396/397-es aminosavakat változtattuk.

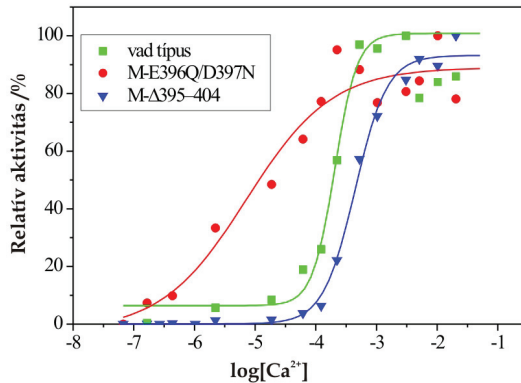
A savas hurokban a negatív töltések pozitívrá cserélése szintén lecsökkentette az enzim kalcium igényét. A páros csere mellett, egyszeres cserét is végrehajtottunk (M-E397K), melynek hatása nagyságrendileg megegyezik a kettős cseréléssel, viszont egyik eset sem közelíti meg a neutrális aminosavra cserélés hatását. Ennek magyarázata lehet egy hurok régióon belüli új sóhíd kialakulása, mellyel más savas aminosav kerül a szemközti katalitikus domén K230 aminosav közelébe. Ezeket a mutációs változtatásokat m-kalpainon végeztük el.

A harmadik típusú módosítás a savas hurok régió, annak teljes megszüntetése volt. Az m-kalpainon a 395-404-es aminosavak delécioja nagymértékben, majd kétszeresére növelte az

aktiválódás kalcium igényét. Azaz, annak ellenére, hogy olyan kölcsönhatásokat szüntettünk meg, melyeknek az aktiválódás során is módosulniuk kell, nem csökkent, hanem pont ellenkezőleg jelentősen növekedett a szükséges kalcium-ion koncentráció.



15. ábra: A kalpain B és két savas hurok mutáns aktivitásának kalcium-ion koncentráció függése



16. ábra: Az m-kalpain és két savas hurok mutáns aktivitásának kalcium-ion koncentráció függése

A transducer lánc mutánsainak első csoportjába olyan változtatások tartoznak, melyek a transzducer lánc és a savas hurok régió közötti kölcsönhatásokat érintik. Ebben a régióban két, az E393-K506 és a D395-K505 közötti sóhid jelenteti az összeköttetést. Egyszeres, illetve kétszeres mutációval a lizinet neutralis aminosavakra cseréltük. Ekkor az enzimek aktiválódásához szükséges kalcium igény jelentősen megnövekedett, ami azt valószínűsíti, hogy előnyös, ha ezek a kölcsönhatások az aktiválódás során fennmaradnak.

Második lépésben a transducer lánc III-as doménon kívüli N-terminális régióját vizsgáltuk. Arra voltunk kíváncsiak, hogy mennyire fontos a III-as domént elhagyó lánc és a β -peptid közötti távolság, ezért inszerciós és deléciós mutációt is kialakítottunk. Valamint a D513-R628 és D514-R628 közötti sóhidak megszüntetésének hatását is vizsgáltuk, egyszeres, kétszeres és háromszoros mutációval, ahol a savas aminosavakat neutrálisra cseréltük. Minden esetben azt tapasztaltuk, hogy a mutáció csökkentette az aktiválódás kalcium-ion igényét, azaz a sóhidak megszűnése előnyös az aktiválódás során. A legjelentősebb változást a deléció okozta, ami érthető, hiszen az eredetileg is nyújtott állapotban lévő láncot rövidítettük, így feszesebbé téve a szerkezetet.

A harmadik csoportba a transducer lánc közepén elhelyezkedő β -peptidet érintő mutációkat soroltuk. Itt is kettős célunk volt, egyrészt egy ionos kölcsönhatás megszüntetése, ami az E517-K637 aminosavak között található a molekulában, melyet egy bázikus mutációval kívántunk elérni (M-E517K). Másrészt a rövid szerkezeti elemet kívántuk megszüntetni, ezért egy prolin aminosavat helyeztünk a lemez N-terminális végére (M-E517P). Mindkét esetben azt kaptuk, hogy a mutáns enzim kalcium-igénye alacsonyabb, azaz kevesebb kalcium-ion is aktiválni képes az enzimet. Más szóval előnyös, ha ezek a kölcsönhatások is felszakadnak az aktiválódás során.

A negyedik csoportba azok a mutációs változtatások tartoznak, melyek a transducer lánc rövid β -lemeztől C-terminális irányba érintik a láncot. Ezen a szakaszon elsősorban a láncméret változtatásának hatásaira voltunk kíváncsiak, ezért itt is beszúrtunk, illetve kivágtunk egy-egy aminosavat, valamint egy jelentős kölcsönhatás, az E521-K606 közötti sóhid ellen irányuló mutációs változtatást alakítottunk ki, savas aminosavak neutrálisra cserélésével. A láncméret változtatása nem befolyásolta számottevően az enzimaktiválódáshoz szükséges kalcium igényt, viszont a kölcsönhatás megszüntetése jelentősen csökkentette azt.

Általánosságban elmondható, hogy azok a mutációk, melyek az aktiválódás során megszűnő kölcsönhatásokat érintenek, csökkentik, míg azok melyek lényeges és az

aktiválódás során megmaradó kölcsönhatásokat rombolnak le, növelik az aktiválódás kalcium-ion igényét.

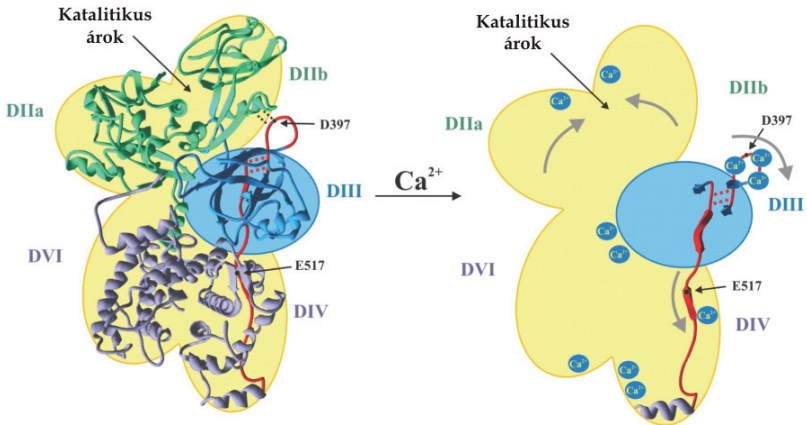
V.1.4. A modell („Extended transducer”)

A kalpain inaktív proenzimként keletkezik a sejtben. Az aktivitás hiányának oka, hogy a katalitikus aminosavak túlságosan messze helyezkednek el egymástól, és a katalitikus árok egy kifeszített konformációban rögzül. Ez a rögzülés két ponton valósul meg, egyrészt a II-es domén N-terminális fele a kis alegységgel lép kölcsönhatásba, míg a katalitikus domén C-terminális oldala sóhidakon keresztül a III-as domén savas aminosavakban gazdag hurok régiójához van rögzülve. Ahhoz, hogy az enzim aktiválódjon, és az árok össze tudjon záródni, a rögzülési pontoknak fel kell lazulniuk. Modellünk szerint, a savas hurokban kötődő kalcium-ionok leárnyékolják a savas aminosavak negatív töltését, így gyengítve a kölcsönhatást a II-es doménnel. Egy másik kalcium-ionok hatására bekövetkező folyamat a kalmodulinszerű domének kalcium-ion kötése. Ez egy olyan kis konformációs változást okoz, ami során a IV-es domén N-terminális a molekula középpontjától kifelé mozdul el. Így a IV-es domén előtti, már eleve is egy kifeszített, energetikai szempontból kedvezőtlen konformációban rögzített „transducer” lánc egyik vége megrántódik. A lánc magával húzza a III-as domént, s ezzel a III-as domén savas hurok régióját is eltávolítja a II-es doméntől, mivel a transducer lánc N-terminális közvetlen sóhidakkal rögzül a savas hurok régió N-terminális részéhez. Elképzelésünk szerint ezt az elmozdulást még jelentősebbé teheti, hogy a kifeszült állapotban lévő transducer rögzülési pontjai fellazulnak, így az flexibilisebbé válik, és így szabadon bejárhatja a konformációs sokaságot. A lehetséges konformációk közül csak kevés ível át ekkora távolságot, vagyis a konformerek átlagos hossza rövidebb, ami valószínűsíti, hogy a lánc húzóerőt is kifejt a III-as doménre.

Azok a mutációk, melyek a III-as domén savas hurok régiója és a II-es domén közötti kölcsönhatásokat szüntették meg, csökkentették az enzim aktiválódásához szükséges kalcium-ion igényét, hiszen kevesebb kötésnek kellett fellazulnia/felszakadnia a katalitikus árok összezárulásához. Viszont azon mutációk, melyek a savas hurok és a transducer lánc közötti kölcsönhatásokat szüntették meg, növelték az enzim kalcium igényét, mert bár a transducer lánc elmozdul, a III-as doménben lévő rögzülési pontjait megszüntették, így nem tudja magával rántani a savas hurok régiót. A transducer lánc közepén történt mutációs változtatásokkal a transducer belső rögzülési pontjait vizsgáltuk. Azt találtuk, hogy a kötődés fellazulását segítő mutációk elősegítik az aktiválódást, azaz kevesebb kalcium-ion szükséges

az enzim aktiválódásához. Ez érthető is, ha meggondoljuk, hogy az aktiválódás szempontjából kedvezőtlen kölcsönhatásokat szüntettünk meg.

Mindezen eredmények alapján egy modellt állítottunk fel (17. ábra), melynek lényege, hogy a savas hurok régió és a transducer lánc, noha nem egy szerkezeti egység, de funkcionálisan egy olyan egységet alkot, ami közvetíteni képes a kalcium kötő doménekben a kalcium ionok megkötése során bekövetkező kis konformációs változást a katalitikus centrum felé. Egyfajta aktiválódási kapcsolóként (savas hurok régió) és erősítőként (transducer lánc) is szolgál, mely nem csak közvetíti a jelet, hanem fel is erősíti azt. Ezt a modellt „extended transducer”-nek, azaz egy kiterjesztett erőátviteli egységnek neveztük el.



17. ábra: A kalpain aktiválódás modellje.

V.2. Kalpain szubsztrát keresés

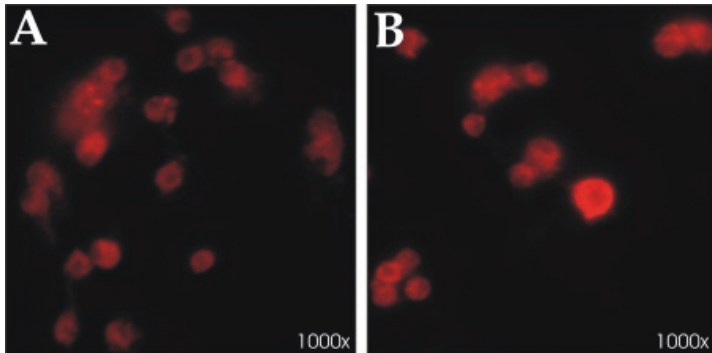
V.2.1. A keresési módszer elve

A szubsztrát-jelöltek kereséséhez a sejteket három egyenlő csoportba osztottuk. Az első csoport a kontroll (kontroll minta), ezeket a sejteket nem érte semmilyen külső behatás. A második csoportban lévő sejteket egy specifikus kalcium ionofórral, ionomicinnel kezeltük, miközben a tápban a kalcium koncentrációt is megemeltük. Az ionomicin egy kalciumcsatornát nyitó vegyület, melynek segítségével megnövelhető az intracelluláris kalcium-ion szint. Ez a citoplazmatikus kalcium koncentráció növekedés bekapcsolja a kalpainokat, így ebben az esetben kalpain aktiválódást értünk el (aktivált minta). A harmadik csoportban lévő sejteket ugyanúgy kezeltünk, mint az aktivált mintát, azzal a különbséggel, hogy egy specifikus kalpain inhibitor is alkalmaztunk (PD150606), mellyel a kalcium-ion koncentráció növekedés ellenére kalpain gátlást értünk el (inhibitoros minta). Ez az inhibitor egy reverzibilis, nem az aktív centrumhoz kötődő vegyület (11. ábra).

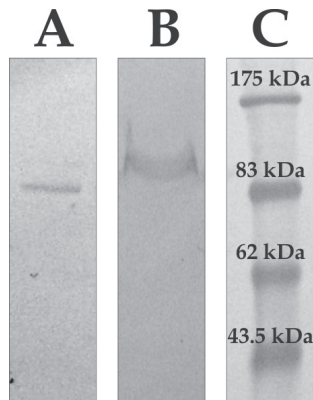
A kontroll mintából származó fehérjék a sejt nyugalmi állapotát tükrözik, míg az aktivált mintában, az intracelluláris kalcium koncentráció növekedés hatására bekövetkező összes változás megismerhető. Ilyen változás többek közt a kalcium ionok által aktivált kalpain szubsztrátbontása. Az inhibitoros minta szintén valamennyi kalcium ion okozta változásról tanúskodik, kivéve, hogy a kalpain gátlásával az enzim nem bontja szubsztrátjait ezekben a sejtekben.

V.2.2. Endogén kalpain formák immunológiai detektálása

A kalpain szubsztrátok kereséséhez *Drosophila* Schneider S2 sejteket használtunk. A *Drosophilában* található négy kalpain gén közül kettő, a kalpain A és a kalpain B az, mely aktív ubikviter előfordulású forma, így legalább az egyik vagy mindkettő jelenléte valószínűsíthető. Ennek megállapításához immunológiai analíziseket végeztünk. A kalpain A és kalpain B formára specifikus poliklonális ellenanyaggal megfestettük a sejteket, amik igazolták mindkét kalpain forma jelenlétét az S2 sejtekben (18. ábra). A keresztreakció kizárásához, azaz, hogy csak az egyik forma van jelen a sejtekben, amit mindkét poliklonális ellenanyag felismer Western-blot kísérletet is végrehajtottunk S2 sejt kivonattal (19. ábra). Nem kaptunk semmilyen keresztreakciót, a kétfajta ellenanyag segítségével sikerült mindkét kalpaint külön kimutatnunk.



18. ábra: Endogén kalpain kimutatás S2 sejtekben. Kalpain A elleni ellenanyaggal (A) és kalpain B elleni ellenanyaggal (B) festve.

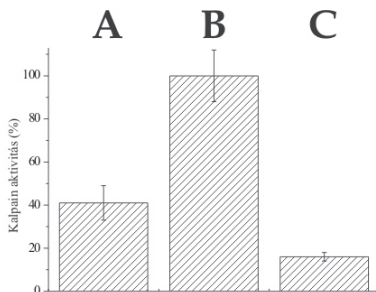


19. ábra: S2 sejtek Western analízise. A: kalpain A elleni elsődleges, B: kalpain B elleni elsődleges ellenanyagot használva. C: fehérje marker

V.2.3. Kalpain aktivitásmérés

Az endogén kalpain jelenlétének kimutatása után ellenőriztük, hogy a három különböző mintában az elvárásunknak megfelelő-e a mérhető kalpain aktivitás, azaz, az aktivált mintában valóban nagyobb aktivitás mérhető-e, mint a többi mintában. Ezért kalcium jelenlétében és hiányában, valamint kalpain gátlószer mellett is megmértük a sejtextraktókból a kalpain aktivitását (20. ábra). Ezekhez a kísérletekben nem a kalpain szerkezet felderítéséhez használt dipeptid szubsztrátot alkalmaztuk, mivel az extraktumban más proteázok is, a

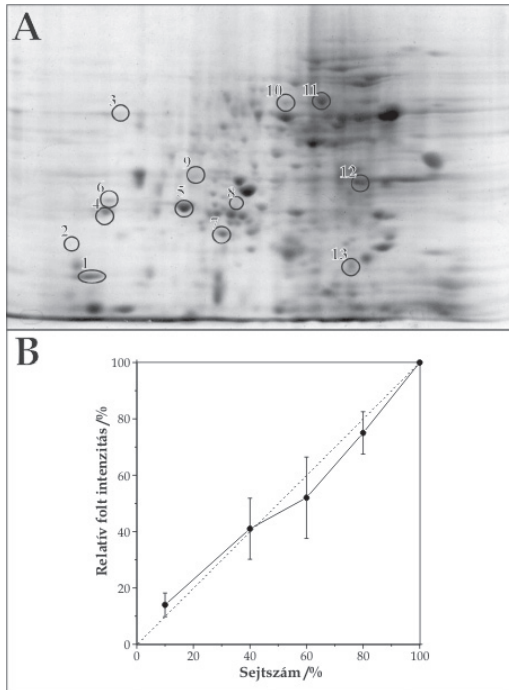
kalpainnal összemérhető szinten bontották azt, hanem egy másik, a csoportunk által kifejlesztett és a kalpainra sokkal specifikusabb, módosított peptidet alkalmaztunk (Tompa és mts. 2004). A kapott eredmények összhangban vannak az általunk elvártakkal, azaz az aktivált mintában szignifikánsan nagyobb proteáz aktivitást mértünk, mint a kontroll, illetve az inhibitor jelenlétében. Ezeket a méréseket Alexa Anita munkatársam végezte.



20. ábra: S2 sejtek endogén kalpain aktivitásának mérése. A: a kontroll mintában mérhető aktivitás, B: az aktivált mintában mérhető aktivitás, C: az inhibitoros mintában mérhető kalpain aktivitás.

V.2.4. Reprodukálhatósági teszt

Ahhoz, hogy a módszert használni tudjuk a szubsztrátok keresésére, meg kellett győződnünk arról, alkalmas-e az általunk használt rendszer a folt intenzitások megbízható kiértékelésére. Ehhez kalibráló geleteket készítettünk, amik segítségével ellenőriztük, hogy arányos-e mért jel, esetünkben foltintenzitás, a felvitt fehérje mennyiségével. Öt különböző mennyiségű sejt extraktumot vittünk fel és futtatunk meg a kétdimenziós geleken, majd 13 véletlenszerűen kiválasztott folt intenzitását vizsgáltuk. A foltokat igyekeztünk úgy kiválasztani, hogy intenzivebb és halványabb foltokat is értékeljünk, azaz minél jobban lefedjük a várható intenzitás értékeket. Az átlagos foltintenzitásokat a géltre vitt sejtexteraktum függvényében ábrázoltuk (21. ábra). A diagramon ábrázolt pontok kis szórással ugyan, de egy egyenesre illeszkednek, így sikerült igazolnunk, hogy a gélen található foltok intenzitása arányos a fehérjemennyiséggel.



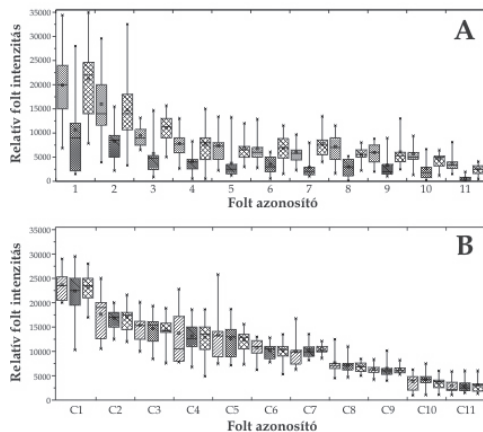
21. ábra: A 2D ELFO reprodukálhatóságának ellenőrzése. A: 2D-s gélkép, a számozott foltok a kiértékelés ellenőrzéshez felhasznált foltok. B: A kiválasztott foltok foltintenzitás átlagának változása a géltre vitt sejtextraktum mennyiségének függvényében (a 100%-os mennyiségre normálva; a hibaszó a standard deviációt jelenti). A szaggatott vonaltól való eltérés az elméleti ideális értékektől való eltérést jelenti.

V.2.5. Azonosított szubsztrátok

A 2D-s gelek közül kiválasztottuk a legjobb 36-ot, 12-12 gélt a különböző típusú minták közül, és meghatározzuk az egyes foltokhoz tartozó koncentráció különbségeket. Az összerendezett, normalizált és átlagolt foltok között 11 olyat találtunk, melyek intenzitása az elvárásainknak megfelelően változott. Azaz, abban a mintában, melyben a kalpain aktiválva volt szignifikánsan kisebb koncentrációban volt jelen a folthoz tartozó fehérje, mint a kontroll, illetve az inhibitor jelenlétében kezelt mintákban (22. ábra,

3. Táblázat). A 11 foltban található fehérjéket tömegspektrometria segítségével azonosítottuk (

4. Táblázat).



22. ábra: A 2D-s gélről azonosított foltok (1-11) és 11 kontroll folt (C1-C11) statisztikai analízise (box chart). Az ábrán minden folthoz a kontroll, az aktivált és az inhibitoros gélen meghatározott foltintenzitás értékek láthatóak. A hasábok a 25-75%-os, a hibászlók a 1-99%-os konfidencia intervallumhoz tartoznak.

Foltazonosító	A vs. B	A vs. C	B vs. C
1	0,0044	0,2344	0,0225
2	0,0111	0,6948	0,0049
3	0,0033	0,9762	0,0025
4	0,0046	0,6928	0,0199
5	0,0005	0,1195	0,0008
6	0,0145	0,9310	0,0295
7	0,0117	0,1445	0,0014
8	0,0127	0,6992	0,0202
9	0,0041	0,9088	0,0240
10	0,0013	0,0968	0,0001
11	0,0001	0,0837	0,0000
C1	0.3690	0.7296	0.6649
C2	0.6305	0.6788	0.8417
C3	0.6555	0.5147	0.7720
C4	0.7667	0.7024	0.8541
C5	0.6657	0.4266	0.7989
C6	0.5304	0.4936	0.9025
C7	0.7468	0.4306	0.6542
C8	0.3552	0.2565	0.7167
C9	0.8587	0.8368	0.7270
C10	0.5801	0.5468	0.3367
C11	0.9519	0.8457	0.9065

3. Táblázat: Az azonosított foltok (1-11) és 11 kontroll folt (C1-C11) Student t-test értékei. A t-test két adatsor értékeinek összehasonlításával meghatározza, hogy a két adatsor azonos, vagy különböző átlagérték körül ingadozik. Ha a meghatározott p-érték kisebb, mint 0,05, akkor a két adatsor szignifikánsan különböző (ez szürke háttér jelzi a táblázatban), ha nagyobb, mint 0,95, akkor biztosan megegyező a két adatsor által mért érték. A: kontroll, B: aktivált, C: inhibitoros kísérletek adatai.

Folt azonosító	GenBank Kód	A fehérje neve	Egyedi peptidek ^a	Szekvencia lefedettség %
1	NP_572775	Regucalcin	9	36
2	NP_649757	Aldo/keto reductase	2	5
3	NP_649069	Acyl-Coenzyme A dehydrogenase homolog	3	9
4	NP_649925	Homolog to co-chaperone p23	3	17
	NP_651760	Nucleoplasmin	2	10
5	NP_611964	Glutathione S-transferase	2	8
	NP_788765	Triosephosphate isomerase	2	5
6	NP_523532	Proteasome 35kD subunit	2	9
7	NP_650048	Translationally-controlled tumor protein homolog (TCTP)	6	41
	NP_731595	Jupiter	2	10
	NP_609479	Deoxyuridine triphosphatase	1	5
8	NP_477354	Hsp70/Hsp90 organizing protein	2	5
9	NP_524237	Vacuolar H[+]-ATPase 26kD E subunit	2	4
10	NP_523683	Peroxisredoxin	2	10
11	NP_729726	Aldo/keto reductase	5	16

4. Táblázat: Az azonosított foltok tömegspektrometriás (LC-MS/MS) azonosítási adatai.

^aAzokat a peptid találatokat, melyek a szignifikancia szint feletti voltak (érték > 58) automatikusan elfogadtuk, azokat, melyek annak közelébe estek egyedileg bíraltuk el.

A #1 számú mintában regucalcint találtunk. A regucalcin egy citoszolban elhelyezkedő kalciumkötő fehérje, mely képes a membránok lipidjeihez kötni (Yamaguchi 2000). Az intracelluláris kalcium koncentrációt szabályozza azáltal, hogy plazmamembránban kalcium-pumpákat aktivál, valamint elősegíti a mitokondriális kalcium felvételt. *In vitro* kísérletekben kimutatták, hogy a regucalcin képes a neutrális cisztein-proteázokat aktiválni, így a kalpainokat is, méghozzá egy kalciumtól független útvonalon (Baba és Yamaguchi 1999, Yamaguchi és Nishina 1995).

A #2 és #11 számú foltokban, egy-egy aldo-keto reduktazt azonosítottunk. Az aldo-keto reduktazők NADPH-függő oxidoreduktazők, melyek széles tartományban katalizálják a C-tartalmú reakciókat, aldehidekből és ketonokból alkoholokat állítanak elő. A fiziológias funkciójukon kívül detoxifikációs folyamatokban is részt vesznek (Inoue és mts. 1993).

A #3 számú foltban egy acil-coenzimA dehidrogenáz homológot találtunk. Az enzimsalád, melybe ez a fehérje is tartozik az acil-CoA észterek α , β -dehidrogenációjáért felelősek, miközben elektronokat adnak át a flavoproteineknek (Beinert és mts. 1956, He és mts. 2003).

A #4 számú foltban egy p23 cochaperon homológot és egy nukleoplazmin azonosítottunk. A p23 homológ biológiai funkciója *Drosophilában* még nem ismert. A nukleoplazmin a legnagyobb mennyiségben előforduló fehérje a sejtmagban, melynek fő feladata a kromatin átszervezés és a helyes hiszton-DNS kapcsolat kialakítása (Banuelos és mts. 2003). Nukleoplazmin volt az első fehérje, melyről a chaperon aktivitást kimutatták (Laskey és mts. 1978).

A #5 számú foltban két fehérjét azonosítottunk, egy glutation S-transzferázt és egy triózfoszfát izomerázt. A *Drosophila* glutation S-transzferáz funkciója nem ismert, de a GST enzimek a detoxifikációs folyamatokban játszanak szerepet, azáltal, hogy az elektrofil vegyületekhez glutationt kapcsolnak (Strange és mts. 2001). A másik azonosított fehérje, a triózfoszfát izomeráz (TPI) egy, a glikolízisben szerepet játszó enzim, a DHAP \rightarrow G3P reakciót katalizálja (Rieder és Rose 1959). Egy tanulmány szerint a glikolízisben résztvevő gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz, a triózfoszfát izomeráz és a piruvát kináz része egy nagy méretű K^+ -ATP csatorna komplexnek (Dhar-Chowdhury és mts. 2005). A mostani kutatások leginkább a TPI patológiás szerepét vizsgálják. Megfigyelték ugyanis, hogy számos betegségben a TPI szubsztrát átalakítási képessége megváltozik, miközben a sejt energiaszintjében nincs változás (Celotto és mts. 2006).

A #6 számú mintában a proteoszóma α -típusú 35 kDa alegységét találtuk. Az ubikvitin-proteoszóma rendszer felelős a sejtben található fehérjék 80%-ának lebontásáért (Wang és Maldonado 2006). A proteoszóma egy 20S katalitikus, hordó alakú alapkomplexből, és egy 19S szabályozó komplexből áll. A katalitikus egység 4 gyűrűből tevődik össze, melyet 7-7 fehérjeegység alkot. A középső két gyűrű β -egységekből, míg a két szélső gyűrű homológ α -egységekből áll (Powell 2006). A β -egységek felelősek a proteoszóma aktivitásáért. Az α -egységeknek nincs proteolitikus aktivitása, aktivitásszabályozó szereppel rendelkeznek, valamint a degradációtól védik a proteoszómát annak inaktív állapotában (Groll és Huber 2003). A kalpainok „upstream” helyezkednek el a proteoszómához képest, ami azt jelenti,

hogy képesek a proteozómát aktiválni (Smith és Dodd 2007). Megfigyelték, hogy a kalpain hasítás eredményeként keletkező fehérje fragmensek fokozzák a proteozóma aktivitását (Jackman és Kandarian 2004). A kalpainról ismert, hogy hatással van a fehérjeszintézisre azáltal, hogy gátolja az Akt jelátviteli útvonalat (Smith és Dodd 2007). A proteozóma kalpain általi hasítása felveti a „protein turnover” egy alternatív szabályozási útvonalának lehetőségét.

A #7 számú foltban három fehérjét is azonosítottunk, egy transláció által szabályozott tumor fehérje (TCTP) homológot, egy Jupitert és egy dezoxiuridin-trifoszfátáz. A TCTP egy kalciumkötő képességgel rendelkező, erősen konzervált fehérje eukarióta sejtekben (Feng és mts. 2007). Funkciói két fő, a növekedéshez köthető (Hsu és mts. 2007) és immunitáshoz köthető (MacDonald és mts. 2001) csoportba sorolhatóak. A második, ebben a foltban azonosított fehérje a Jupiter. Erről a *Drosophila* fehérjéről nagyon keveset tudunk, ellentétben a harmadikként azonosított fehérjéről, a dUTPázról. A dUTP-dUMP átalakulást katalizálja (Shlomain és Kornberg 1978), mely nélkülözhetetlen a dTTP szintézishez, és így a DNS szintézishez és DNS javítás folyamatához (Bekesi és mts. 2004).

Az #8 számú foltban a Hsp70/Hsp90 szervezőfehérjét (röviden: Hop) azonosítottuk. A Hop szervező fehérje a szteroid receptorok felépülését segíti, (mint például a glükokortikoid receptorét) azáltal, hogy kölcsönhatást alakít ki a szteroid receptor és a Hsp70 és/vagy Hsp90 között, ami nélkülözhetetlen a szteroid receptor kötőszébének kinyílásához (Pratt és Toft 2003). A humán Hop külön Hsp70 és Hsp90 kötőhellyel is rendelkezik, míg *Drosophila* megfelelőjében egy, eddig még kevésbé ismert funkciójú, domén hiányzik (Carrigan és mts. 2005). A Hsp90 az élő sejtben számos funkcióval rendelkezik, így nem meglepő, hogy a sejt fehérjeinek még nyugalmi állapotban is 1-2%-át alkotja (Pratt és Toft 2003). Korábbi tanulmányokban kimutatták, hogy a Hsp90 egy valódi kalpain szubsztrát (Minami és mts. 1994).

A #9-es számú foltban egy H^+ ATPáz 26 kDa-os E alegységét találtuk, ami egy ATPvel hajtott proton pumpa része (Guo és mts. 1996).

A #10 számú foltban egy peroxiredoxint találtunk. Emlősökben 16 gén alkotja a peroxiredoxinok családját. A peroxiredoxin egy antioxidáns fehérje, melynek fő funkciója a sejt H_2O_2 tartalmának alacsony szinten tartása, és az oxidatív stressz megakadályozása. A NKEF-B (natural killer enhancing factor B), melynek humán formáját calpromotinnek is neveznek, szintén egy peroxiredoxin, mely már μM -s Ca^{2+} koncentráció hatására kölcsönhatásba lép a sejtmembránnal (Plishker és mts. 1986). Ez a kölcsönhatás egy kalciumfüggő kálium transzportot szabályoz (Moore és mts. 1991). *In vitro* kísérletekben kimutatták,

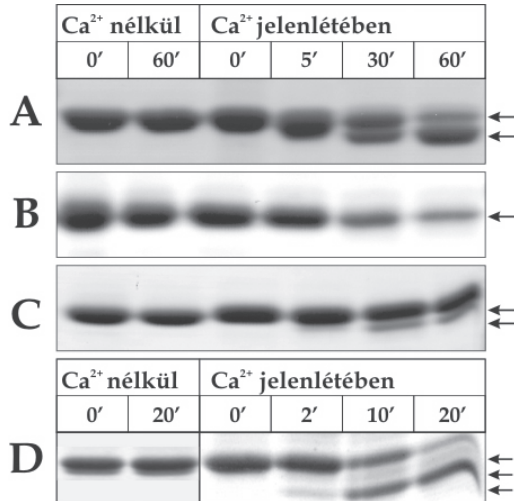
hogy mind az μ - és mind az m-kalpain is képes az NKEF-B-t hasítani (Schroder és mts. 1998). Egy másik tanulmány szerint a peroxiredoxin-3, mely egy mitokondriális peroxiredoxin forma, szubsztrátja az m-kalpainnak. Ezt a hasítást rekombináns fehérjékkel *in vitro* és immunoblottalással *in vivo* is kimutatták (Mukhopadhyay és mts. 2006).

V.2.6. A szubsztrátok ellenőrzése

A kísérleti rendszerünkben 11 lehetséges kalpain szubsztrát fehérjefoltot azonosítottunk, melyben a tömegspektrometriás azonosítás 15 fajta fehérjét talált. Annak eldöntésére, hogy ezek a találatok megbízhatóak-e, vagyis hogy képes-e a módszer a tényleges kalpain szubsztrátok kimutatására, a találatok egy részét rekombináns módszerrel ellenőriztünk.

Az, hogy azokban a foltokban, melyekből többféle fehérjét is azonosítottunk, csak az egyik, vagy esetleg mindegyik fehérje szubsztrátja-e a kalpainnak, a 2D-s kísérletekből nem állapítható meg. Ezért az ellenőrzéshez ezek közül, és a foltokban egyedülnek azonosított fehérjék közül is kiválasztottunk összesen négyet. E négy fehérje közül egyet, a dUTPáz, Vértessy Beáta csoportjától készen kaptuk, míg a másik hármat – egy aldo-keto redukáz, a glutation S-transzferáz, és a p23 cochaperont – *Drosophila* cDNS könyvtárból klónoztuk meg, majd *E. coli* expressziós rendszerben fejeztettük ki.

A fehérjék *in vitro* emésztését patkány m-kalpain és *Drosophila* kalpain B segítségével is vizsgáltuk (23. ábra). Mind a négy esetben azt kaptuk, hogy a kiválasztott fehérjét hasítja mindkét kalpain forma, azaz valódi kalpain szubsztrátokat sikerült a 2D-os technikával azonosítanunk.



23. ábra: Négy szubsztrát jelölt fehérje *in vitro* emésztési tesztje. Négy azonosított fehérjét ((A) aldol/keto reduktázt (#2); (B) p23 co-chaperont (#4); (C) glutation S-transzferázt (#5); (D) dUTPázt (#7)) rekombinánsan előállítottuk és *Drosophila* kalpain B-vel emésztettük kalcium jelenlétében (3-6 oszlop) és kalcium nélkül (1-2). A nyilak a teljes fehérje és a fragmensei helyét jelzik.

V.2.7. Kalpain szubsztrát keresés összefoglalása

Célul tűztük ki, egy megbízható, *in vivo* kalpain szubsztrát azonosítására szolgáló technika kidolgozását. Modellrendszernek a *Drosophila* Schneider S2 sejteket választottuk, melyekben kalpain hasításból származó fehérjekoncentráció csökkenéseket kerestünk. Az intenzitás változások detektálására a hagyományos kétdimenziós gélelektroforézis technikát alkalmaztunk kombinálva azzal, hogy a minták egy részében a kalpait aktiváltuk, illetve gátoltuk és ezen értékeket összevetettük a normál, kezeletlen mintából származó értékekkel. A kísérletek elején ellenőriztük, hogy a modellnek használt sejtekben mindkét aktív, ubikviter kalpain forma jelen van, ezek aktivitását mérni is lehet, illetve, a kétdimenziós gélen detektált jel arányos a felvitt fehérjemennyiséggel.

A módszer beállítása után, 36 éves kísérlet eredményei alapján 11 lehetséges kalpain szubsztrátot találtunk, melyeket tömegspektrometria segítségével azonosítottunk. Az azonosított fehérjék közül négyet, rekombináns úton előállított fehérjék alkalmazásával *in*

in vitro körülmények között is ellenőriztünk. Azt találtuk, hogy mindegyik kiválasztott fehérje valódi kalpain szubsztrát, mely alátámasztja a beállított technika alkalmazhatóságát.

Az azonosított fehérjék közül csak egy olyan van (egy peroxiredoxin), melyet az irodalmi adatok kalpain szubsztrátként említenek, a többi fehérje még nem leírt kalpain szubsztrát. Feltételezésünk szerint a korábról ismert és most azonosított szubsztrátok között azért ilyen kicsi a hasonlóság, mert az általunk alkalmazott technika más irányból közelíti a szubsztrátok keresését, mint a korábbi módszerek. Ebből fakadóan az általunk azonosított szubsztrátok akkor nyernek teljes bizonyítást, ha rekombináns technikával, vagy egyéb módszerrel is sikerül igazolni azt, kivételt képez az a négy kiválasztott fehérje, melyeket *in vitro* emésztésekkel már alátámasztottunk.

VI. Összefoglalás

A doktori munkám során a kalpain enzimesalád működését kutattam. Funkciójuk megismeréséhez elengedhetetlenül fontos, hogy alaposan megismerjük magát az enzim molekulát. Az, hogy tudjuk mi a szekvenciája, milyen doménekből áll és milyen mechanizmus szerint fejtí ki hatását, még nem elég ismeret arra, hogy hatékonyan szabályozhassuk működését, és ezzel csökkenthessünk betegségek tüneteinek.

Egyetlen kutatócsoportnak sem sikerült eddig teljes kalpain szerkezetet kalcium-ionok jelenlétében kristályosítani, vagy más szerkezet meghatározó módszerrel feltérképeznie, így nem ismert pontosan, milyen szerkezeti átrendeződések zajlanak az enzim aktiválódása során.

Munkám első részében a kalpain szerkezet egyes elemeinek aktiválódásban betöltött szerepét vizsgáltam irányított mutagenézis technika segítségével, megvizsgálva az enzim és a mutánsok aktiválódásának különbségeit. Az aktiválódásban valószínűleg szerepet játszó pontokon befolyásoltuk az enzim szerkezetét és húsz vizsgált mutáns eredményei alapján egy modellt („extended transducer”) állítottunk fel az aktiválódás során végbemenő konformációs változások magyarázatára. Ennek lényege, hogy egy nyújtott lánc (transducer) és egy sóhidak által rögzített hurok régió (savas hurok) egy szerkezeti és funkcionális egységet alkot, melynek együttes elmozdulása nélkülözhetetlen a kalpain aktiválódása során. A mutációs analízis segítségével feltérképeztük, hogy mely kölcsönhatások szűnnek meg és melyek maradnak meg a kalcium-ionok által okozott aktiválódás alatt. Azonosítottunk egy olyan mutánst, mely a vad típusú enzimnél már négy nagyságrenddel alacsonyabb kalcium-ion koncentrációnál is eléri aktivitásának 40%-át.

Kutatásaim második részében *in vivo* kalpain szubsztrátok keresésével foglalkoztam. Az irodalomban számos fehérjéről leírták már, hogy *in vitro* körülmények között a kalpain hasítja, de csak kevésről igazolták eddig, hogy egy sejtben, *in vivo* körülmények között is végbemegy a proteolízis. Ezért célul tűztük ki egy *in vivo* kalpain szubsztrátkeresési technika kifejlesztését. Célrendszernek a *Drosophila* Schneider S2 sejteket választottuk. A módszerünk elve, hogy összehasonlítjuk a kontroll sejtek fehérjemintázatát olyan sejtek fehérjemintázatával, melyekben a kalpain aktiválva van egy specifikus kalcium ionofór segítségével. Ahhoz, hogy a fals pozitív találatokat kiszűrjük, melyek a kalciumkoncentráció növekedés hatásának következményei, de nem kalpain okozta változások, a sejtek egy harmadik csoportját kalpain inhibitorral és ionofórral kezeltük egyidejűleg. Olyan fehérjéket kerestünk, melyeknek a kalpain aktiválás hatására lecsökken a koncentrációja a kontrollhoz képest, míg inhibitor jelenlétében nem változik jelentősen, azaz a változás kalpain hatásnak

tudható be. Az S2 sejtek fehérjéinek elválasztására a hagyományos kétdimenziós gélelektroforézist alkalmaztuk. Ellenőriztük, hogy a vizsgált sejtekben kifejeződnek az endogén kalpain formák, majd igazoltuk, hogy a beállított rendszerünk képes a fehérjemennyiségben meglévő különbségek pontos kimutatására. Kísérleteink segítségével eddig 11 lehetséges kalpain szubsztrátot találtunk, melyeket tömegspektrometria segítségével azonosítottunk. Négy kiválasztott fehérje rekombináns formájáról pedig *in vitro* is igazoltuk, hogy valódi szubsztrátjai a kalpainnak.

VII. Irodalomjegyzék

Amano, S., Kawasaki, H., Ishiura, S., Kawashima, S., Suzuki, K. és Emori, Y. (1997) Identification of endogenous substrates for Drosophila calpain from a salt-extracted fraction of Drosophila ovaries; J Biochem, 122: 865-871

Arthur, J. S. és Crawford, C. (1996) Investigation of the interaction of m-calpain with phospholipids: calpain-phospholipid interactions; Biochim Biophys Acta, 1293: 201-206

Arthur, J. S., Elce, J. S., Hegadorn, C., Williams, K. és Greer, P. A. (2000) Disruption of the murine calpain small subunit gene, Capn4: calpain is essential for embryonic development but not for cell growth and division; Mol Cell Biol, 20: 4474-4481

Baba, T. és Yamaguchi, M. (1999) Stimulatory effect of regucalcin on proteolytic activity in rat renal cortex cytosol: involvement of thiol proteases; Mol Cell Biochem, 195: 87-92

Banoczi, Z., Alexa, A., Farkas, A., Friedrich, P. és Hudecz, F. (2008) Novel cell-penetrating calpain substrate; Bioconjug Chem, 19: 1375-1381

Banoczi, Z., Tantos, A., Farkas, A., Tompa, P., Friedrich, P. és Hudecz, F. (2007) Synthesis of cell-penetrating conjugates of calpain activator peptides; Bioconjug Chem, 18: 130-137

Banuelos, S., Hierro, A., Arizmendi, J. M., Montoya, G., Prado, A. és Muga, A. (2003) Activation mechanism of the nuclear chaperone nucleoplasm: role of the core domain; J Mol Biol, 334: 585-593

Bartoli, M. és Richard, I. (2005) Calpains in muscle wasting; Int J Biochem Cell Biol, 37: 2115-2133

Beinert, H., Green, D. E., Hele, P., Hoffman-Ostenhof, O., Lynen, F., Ochoa, S., Popjak, G. és Ruysen, R. (1956) Nomenclature of enzymes of fatty-acid metabolism; Science, 124: 614-616

Bekesi, A., Zagyva, I., Hunyadi-Gulyas, E., Pongracz, V., Kovari, J., Nagy, A. O., Erdei, A., Medzihradzsky, K. F. és Vertessy, B. G. (2004) Developmental regulation of dUTPase in *Drosophila melanogaster*; *J Biol Chem*, 279: 22362-22370

Bi, X., Tocco, G. és Baudry, M. (1994) Calpain-mediated regulation of AMPA receptors in adult rat brain; *Neuroreport*, 6: 61-64

Blanchard, H., Grochulski, P., Li, Y., Arthur, J. S., Davies, P. L., Elce, J. S. és Cygler, M. (1997) Structure of a calpain Ca(2+)-binding domain reveals a novel EF-hand and Ca(2+)-induced conformational changes; *Nat Struct Biol*, 4: 532-538

Bradford, H. N., Annamalai, A., Doshi, K. és Colman, R. W. (1988) Factor V is activated and cleaved by platelet calpain: comparison with thrombin proteolysis; *Blood*, 71: 388-394

Bradford, M. M. (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

Branca, D. (2004) Calpain-related diseases; *Biochem Biophys Res Commun*, 322: 1098-1104

Buee, L., Bussiere, T., Buee-Scherrer, V., Delacourte, A. és Hof, P. R. (2000) Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders; *Brain Res Brain Res Rev*, 33: 95-130

Buki, K. G., Bauer, P. I. és Kun, E. (1997) Isolation and identification of a proteinase from calf thymus that cleaves poly(ADP-ribose) polymerase and histone H1; *Biochim Biophys Acta*, 1338: 100-106

Butt, A., Davison, M. D., Smith, G. J., Young, J. A., Gaskell, S. J., Oliver, S. G. és Beynon, R. J. (2001) Chromatographic separations as a prelude to two-dimensional electrophoresis in proteomics analysis; *Proteomics*, 1: 42-53

Carrigan, P. E., Riggs, D. L., Chinkers, M. és Smith, D. F. (2005) Functional comparison of human and *Drosophila* Hop reveals novel role in steroid receptor maturation; *J Biol Chem*, 280: 8906-8911

Celotto, A. M., Frank, A. C., Seigle, J. L. és Palladino, M. J. (2006) *Drosophila* model of human inherited triosephosphate isomerase deficiency glycolytic enzymopathy; *Genetics*, 174: 1237-1246

Chua, B. T., Guo, K. és Li, P. (2000) Direct cleavage by the calcium-activated protease calpain can lead to inactivation of caspases; *J Biol Chem*, 275: 5131-5135

Cox, N. J. (2001) Challenges in identifying genetic variation affecting susceptibility to type 2 diabetes: examples from studies of the calpain-10 gene; *Hum Mol Genet*, 10: 2301-2305

Cox, N. J., Hayes, M. G., Roe, C. A., Tsuchiya, T. és Bell, G. I. (2004) Linkage of calpain 10 to type 2 diabetes: the biological rationale; *Diabetes*, 53 Suppl 1: S19-25

Crawford, C., Brown, N. R. és Willis, A. C. (1990) Investigation of the structural basis of the interaction of calpain II with phospholipid and with carbohydrate; *Biochem J*, 265: 575-579

Crawford, C., Brown, N. R. és Willis, A. C. (1993) Studies of the active site of m-calpain and the interaction with calpastatin; *Biochem J*, 296 (Pt 1): 135-142

Cuerrier, D., Moldoveanu, T. és Davies, P. L. (2005) Determination of peptide substrate specificity for mu-calpain by a peptide library-based approach: the importance of primed side interactions; *J Biol Chem*, 280: 40632-40641

Csizmok, V., Bokor, M., Banki, P., Klement, E., Medzihradzsky, K. F., Friedrich, P., Tompa, K. és Tompa, P. (2005) Primary contact sites in intrinsically unstructured proteins: the case of calpastatin and microtubule-associated protein 2; *Biochemistry*, 44: 3955-3964

Dayton, W. R., Reville, W. J., Goll, D. E. és Stromer, M. H. (1976) A Ca^{2+} -activated protease possibly involved in myofibrillar protein turnover. Partial characterization of the purified enzyme; *Biochemistry*, 15: 2159-2167

Delaney, S. J., Hayward, D. C., Barleben, F., Fischbach, K. F. és Miklos, G. L. (1991) Molecular cloning and analysis of small optic lobes, a structural brain gene of *Drosophila melanogaster*; Proc Natl Acad Sci U S A, 88: 7214-7218

Dhar-Chowdhury, P., Harrell, M. D., Han, S. Y., Jankowska, D., Parachuru, L., Morrissey, A., Srivastava, S., Liu, W., Malester, B., Yoshida, H. és Coetzee, W. A. (2005) The glycolytic enzymes, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, triose-phosphate isomerase, and pyruvate kinase are components of the K(ATP) channel macromolecular complex and regulate its function; J Biol Chem, 280: 38464-38470

Dufty, B. M., Warner, L. R., Hou, S. T., Jiang, S. X., Gomez-Isla, T., Leenhouts, K. M., Oxford, J. T., Feany, M. B., Masliah, E. és Rohn, T. T. (2007) Calpain-cleavage of alpha-synuclein: connecting proteolytic processing to disease-linked aggregation; Am J Pathol, 170: 1725-1738

Dutt, P., Arthur, J. S., Grochulski, P., Cygler, M. és Elce, J. S. (2000) Roles of individual EF-hands in the activation of m-calpain by calcium; Biochem J, 348 Pt 1: 37-43

Elce, J. S., Hegadorn, C., Gauthier, S., Vince, J. W. és Davies, P. L. (1995) Recombinant calpain II: improved expression systems and production of a C105A active-site mutant for crystallography; Protein Eng, 8: 843-848

Farkas, A., Tompa, P., Schad, E., Sinka, R., Jekely, G. és Friedrich, P. (2004) Autolytic activation and localization in Schneider cells (S2) of calpain B from *Drosophila*; Biochem J, 378: 299-305

Feng, Y., Liu, D., Yao, H. és Wang, J. (2007) Solution structure and mapping of a very weak calcium-binding site of human translationally controlled tumor protein by NMR; Arch Biochem Biophys, 467: 48-57

Fukiage, C., Nakajima, E., Ma, H., Azuma, M. és Shearer, T. R. (2002) Characterization and regulation of lens-specific calpain Lp82; J Biol Chem, 277: 20678-20685

Geesink, G. H., Nonneman, D. és 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, R. J., Reynolds, I. J., Shiraha, H., Satish, L., Potter, D. A., Blair, H. C. és 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

Goll, D. E., Thompson, V. F., Li, H., Wei, W. és Cong, J. (2003) The calpain system; *Physiol Rev*, 83: 731-801

Gorg, A., Obermaier, C., Boguth, G., Harder, A., Scheibe, B., Wildgruber, R. és Weiss, W. (2000) The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients; *Electrophoresis*, 21: 1037-1053

Gorg, A., Postel, W. és Gunther, S. (1988) The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients; *Electrophoresis*, 9: 531-546

Graham-Siegenthaler, K., Gauthier, S., Davies, P. L. és Elce, J. S. (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

Greenwood, A. F. és Jope, R. S. (1994) Brain G-protein proteolysis by calpain: enhancement by lithium; *Brain Res*, 636: 320-326

Gregoriou, M., Willis, A. C., Pearson, M. A. és Crawford, C. (1994) The calpain cleavage sites in the epidermal growth factor receptor kinase domain; *Eur J Biochem*, 223: 455-464

Groll, M. és Huber, R. (2003) Substrate access and processing by the 20S proteasome core particle; *Int J Biochem Cell Biol*, 35: 606-616

Guo, Y., Wang, Z., Carter, A., Kaiser, K. és Dow, J. A. (1996) Characterisation of vha26, the *Drosophila* gene for a 26 kDa E-subunit of the vacuolar ATPase; *Biochim Biophys Acta*, 1283: 4-9

Guroff, G. (1964) A Neutral, Calcium-Activated Proteinase from the Soluble Fraction of Rat Brain; *J Biol Chem*, 239: 149-155

Gustafsson, J. S., Blomberg, A. és Rudemo, M. (2002) Warping two-dimensional electrophoresis gel images to correct for geometric distortions of the spot pattern; *Electrophoresis*, 23: 1731-1744

Gygi, S. P., Corthals, G. L., Zhang, Y., Rochon, Y. és Aebersold, R. (2000) Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology; *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 9390-9395

Hajimohammadreza, I., Raser, K. J., Nath, R., Nadimpalli, R., Scott, M. és Wang, K. K. (1997) Neuronal nitric oxide synthase and calmodulin-dependent protein kinase II α undergo neurotoxin-induced proteolysis; *J Neurochem*, 69: 1006-1013

Hanna, R. A., Garcia-Diaz, B. E. és Davies, P. L. (2007) Calpastatin simultaneously binds four calpains with different kinetic constants; *FEBS Lett*, 581: 2894-2898

Hanson, B. J., Schulenberg, B., Patton, W. F. és Capaldi, R. A. (2001) A novel subfractionation approach for mitochondrial proteins: a three-dimensional mitochondrial proteome map; *Electrophoresis*, 22: 950-959

He, M., Burghardt, T. P. és Vockley, J. (2003) A novel approach to the characterization of substrate specificity in short/branched chain Acyl-CoA dehydrogenase; *J Biol Chem*, 278: 37974-37986

Hell, J. W., Westenbroek, R. E., Breeze, L. J., Wang, K. K., Chavkin, C. és Catterall, W. A. (1996) N-methyl-D-aspartate receptor-induced proteolytic conversion of postsynaptic class C L-type calcium channels in hippocampal neurons; *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93: 3362-3367

Hiraga, A. és Tsuiki, S. (1986) Activation of a D-form of rabbit muscle glycogen synthase by Ca²⁺-activated protease; FEBS Lett, 205: 1-5

Hirai, S., Kawasaki, H., Yaniv, M. és Suzuki, K. (1991) Degradation of transcription factors, c-Jun and c-Fos, by calpain; FEBS Lett, 287: 57-61

Horikawa, Y., Oda, N., Cox, N. J., Li, X., Orho-Melander, M., Hara, M., Hinokio, Y., Lindner, T. H., Mashima, H., Schwarz, P. E., del Bosque-Plata, L., Oda, Y., Yoshiuchi, I., Colilla, S., Polonsky, K. S., Wei, S., Concannon, P., Iwasaki, N., Schulze, J., Baier, L. J., Bogardus, C., Groop, L., Boerwinkle, E., Hanis, C. L. és Bell, G. I. (2000) Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus; Nat Genet, 26: 163-175

Hosfield, C. M., Elce, J. S., Davies, P. L. és Jia, Z. (1999) Crystal structure of calpain reveals the structural basis for Ca(2+)-dependent protease activity and a novel mode of enzyme activation; Embo J, 18: 6880-6889

Hosfield, C. M., Moldoveanu, T., Davies, P. L., Elce, J. S. és Jia, Z. (2001) Calpain mutants with increased Ca²⁺ sensitivity and implications for the role of the C(2)-like domain; J Biol Chem, 276: 7404-7407

Hsu, Y. C., Chern, J. J., Cai, Y., Liu, M. és Choi, K. W. (2007) Drosophila TCTP is essential for growth and proliferation through regulation of dRheb GTPase; Nature, 445: 785-788

Huang, Y. és Wang, K. K. (2001) The calpain family and human disease; Trends Mol Med, 7: 355-362

Inoue, S., Sharma, R. C., Schimke, R. T. és Simoni, R. D. (1993) Cellular detoxification of tripeptidyl aldehydes by an aldo-keto reductase; J Biol Chem, 268: 5894-5898

Ito, M., Tanaka, T., Nunoki, K., Hidaka, H. és Suzuki, K. (1987) The Ca²⁺ -activated protease (calpain) modulates Ca²⁺/calmodulin dependent activity of smooth muscle myosin light chain kinase; Biochem Biophys Res Commun, 145: 1321-1328

Jackman, R. W. és Kandarian, S. C. (2004) The molecular basis of skeletal muscle atrophy; *Am J Physiol Cell Physiol*, 287: C834-843

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

Johnson, G. V. és Foley, V. G. (1993) Calpain-mediated proteolysis of microtubule-associated protein 2 (MAP-2) is inhibited by phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase, but not by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II; *J Neurosci Res*, 34: 642-647

Jordan, J., Galindo, M. F. és Miller, R. J. (1997) Role of calpain- and interleukin-1 beta converting enzyme-like proteases in the beta-amyloid-induced death of rat hippocampal neurons in culture; *J Neurochem*, 68: 1612-1621

Kamei, M., Webb, G. C., Heydon, K., Hendry, I. A., Young, I. G. és Campbell, H. D. (2000) Solh, the mouse homologue of the *Drosophila melanogaster* small optic lobes gene: organization, chromosomal mapping, and localization of gene product to the olfactory bulb; *Genomics*, 64: 82-89

Kishimoto, A., Mikawa, K., Hashimoto, K., Yasuda, I., Tanaka, S., Tominaga, M., Kuroda, T. és Nishizuka, Y. (1989) Limited proteolysis of protein kinase C subspecies by calcium-dependent neutral protease (calpain); *J Biol Chem*, 264: 4088-4092

Kwak, K. B., Kambayashi, J., Kang, M. S., Ha, D. B. és Chung, C. H. (1993) Cell-penetrating inhibitors of calpain block both membrane fusion and filamin cleavage in chick embryonic myoblasts; *FEBS Lett*, 323: 151-154

Laskey, R. A., Honda, B. M., Mills, A. D. és Finch, J. T. (1978) Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA; *Nature*, 275: 416-420

Lilley, K. S., Razzaq, A. és Dupree, P. (2002) Two-dimensional gel electrophoresis: recent advances in sample preparation, detection and quantitation; *Curr Opin Chem Biol*, 6: 46-50

Litersky, J. M. és Johnson, G. V. (1992) Phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase inhibits the degradation of tau by calpain; *J Biol Chem*, 267: 1563-1568

MacDonald, S. M., Bhisutthibhan, J., Shapiro, T. A., Rogerson, S. J., Taylor, T. E., Tembo, M., Langdon, J. M. és Meshnick, S. R. (2001) Immune mimicry in malaria: *Plasmodium falciparum* secretes a functional histamine-releasing factor homolog *in vitro* and *in vivo*; *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 10829-10832

Martin, S. J., O'Brien, G. A., Nishioka, W. K., McGahon, A. J., Mahboubi, A., Saido, T. C. és Green, D. R. (1995) Proteolysis of fodrin (non-erythroid spectrin) during apoptosis; *J Biol Chem*, 270: 6425-6428

Melloni, E., Michetti, M., Salamino, F., Minafra, R. és Pontremoli, S. (1996) Modulation of the calpain autoproteolysis by calpastatin and phospholipids; *Biochem Biophys Res Commun*, 229: 193-197

Miklos, G. L. és Maleszka, R. (2001) Protein functions and biological contexts; *Proteomics*, 1: 169-178

Minami, Y., Kimura, Y., Kawasaki, H., Suzuki, K. és Yahara, I. (1994) The carboxy-terminal region of mammalian HSP90 is required for its dimerization and function *in vivo*; *Mol Cell Biol*, 14: 1459-1464

Moldoveanu, T., Hosfield, C. M., Lim, D., Elce, J. S., Jia, Z. és Davies, P. L. (2002) A Ca²⁺ switch aligns the active site of calpain; *Cell*, 108: 649-660

Moldoveanu, T., Hosfield, C. M., Lim, D., Jia, Z. és Davies, P. L. (2003) Calpain silencing by a reversible intrinsic mechanism; *Nat Struct Biol*, 10: 371-378

Moldoveanu, T., Jia, Z. és Davies, P. L. (2004) Calpain activation by cooperative Ca²⁺ binding at two non-EF-hand sites; *J Biol Chem*, 279: 6106-6114

Moore, R. B., Mankad, M. V., Shriver, S. K., Mankad, V. N. és Plishker, G. A. (1991) Reconstitution of Ca²⁺-dependent K⁺ transport in erythrocyte membrane vesicles requires a cytoplasmic protein; *J Biol Chem*, 266: 18964-18968

Muguruma, M., Nishimuta, S., Tomisaka, Y., Ito, T. és Matsumura, S. (1995) Organization of the functional domains in membrane cytoskeletal protein talin; *J Biochem*, 117: 1036-1042

Mukhopadhyay, S. S., Leung, K. S., Hicks, M. J., Hastings, P. J., Youssoufian, H. és Plon, S. E. (2006) Defective mitochondrial peroxiredoxin-3 results in sensitivity to oxidative stress in Fanconi anemia; *J Cell Biol*, 175: 225-235

Murachi, T. (1989) Intracellular regulatory system involving calpain and calpastatin; *Biochem Int*, 18: 263-294

Ohno, S., Emori, Y., Imajoh, S., Kawasaki, H., Kisaragi, M. és 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

Ono, Y., Shimada, H., Sorimachi, H., Richard, I., Saido, T. C., Beckmann, J. S., Ishiura, S. és Suzuki, K. (1998) Functional defects of a muscle-specific calpain, p94, caused by mutations associated with limb-girdle muscular dystrophy type 2A; *J Biol Chem*, 273: 17073-17078

Otani, K., Han, D. H., Ford, E. L., Garcia-Roves, P. M., Ye, H., Horikawa, Y., Bell, G. I., Holloszy, J. O. és Polonsky, K. S. (2004) Calpain system regulates muscle mass and glucose transporter GLUT4 turnover; *J Biol Chem*, 279: 20915-20920

Otsuka, Y. és Goll, D. E. (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

Pal, G. P., Elce, J. S. és Jia, Z. (2001) Dissociation and aggregation of calpain in the presence of calcium; *J Biol Chem*, 276: 47233-47238

Pils, B. és Schultz, J. (2004) Inactive enzyme-homologues find new function in regulatory processes; *J Mol Biol*, 340: 399-404

Pinter, M. és Friedrich, P. (1988) The calcium-dependent proteolytic system calpain-calpastatin in *Drosophila melanogaster*; *Biochem J*, 253: 467-473

Plishker, G. A., White, P. H. és Cadman, E. D. (1986) Involvement of a cytoplasmic protein in calcium-dependent potassium efflux in red blood cells; *Am J Physiol*, 251: C535-540

Powell, S. R. (2006) The ubiquitin-proteasome system in cardiac physiology and pathology; *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 291: H1-H19

Pratt, W. B. és Toft, D. O. (2003) Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery; *Exp Biol Med (Maywood)*, 228: 111-133

Richard, I., Broux, O., Allamand, V., Fougerousse, F., Chiannilkulchai, N., Bourg, N., Brenguier, L., Devaud, C., Pasturaud, P., Roudaut, C. és et al. (1995) Mutations in the proteolytic enzyme calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A; *Cell*, 81: 27-40

Rieder, S. V. és Rose, I. A. (1959) The mechanism of the triosephosphate isomerase reaction; *J Biol Chem*, 234: 1007-1010

Rizo, J. és Sudhof, T. C. (1998) C2-domains, structure and function of a universal Ca²⁺-binding domain; *J Biol Chem*, 273: 15879-15882

Saido, T. C., Sorimachi, H. és Suzuki, K. (1994) Calpain: new perspectives in molecular diversity and physiological-pathological involvement; *Faseb J*, 8: 814-822

Saido, T. C., Yokota, M., Nagao, S., Yamaura, I., Tani, E., Tsuchiya, T., Suzuki, K. és Kawashima, S. (1993) Spatial resolution of fodrin proteolysis in postischemic brain; *J Biol Chem*, 268: 25239-25243

Sasaki, M., Kunimatsu, M. és Ohkubo, I. (1991) Role of calpains and kininogens in inflammation; *Acta Biol Hung*, 42: 231-242

Sasaki, M., Kunimatsu, M., Tada, T., Nishimura, J., Ma, X. J. és Ohkubo, I. (1991) Calpain and kininogen mediated inflammation; *Biomed Biochim Acta*, 50: 499-508

Schad, E., Farkas, A., Jekely, G., Tompa, P. és Friedrich, P. (2002) A novel human small subunit of calpains; *Biochem J*, 362: 383-388

Schroder, E., Willis, A. C. és Ponting, C. P. (1998) Porcine natural-killer-enhancing factor-B: oligomerisation and identification as a calpain substrate *in vitro*; *Biochim Biophys Acta*, 1383: 279-291

Shiraha, H., Glading, A., Chou, J., Jia, Z. és 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

Shlomai, J. és Kornberg, A. (1978) Deoxyuridine triphosphatase of *Escherichia coli*. Purification, properties, and use as a reagent to reduce uracil incorporation into DNA; *J Biol Chem*, 253: 3305-3312

Smith, I. J. és Dodd, S. L. (2007) Calpain activation causes a proteasome-dependent increase in protein degradation and inhibits the Akt signalling pathway in rat diaphragm muscle; *Exp Physiol*, 92: 561-573

Sorimachi, H., Kinbara, K., Kimura, S., Takahashi, M., Ishiura, S., Sasagawa, N., Sorimachi, N., Shimada, H., Tagawa, K., Maruyama, K. és et al. (1995) Muscle-specific calpain, p94, responsible for limb girdle muscular dystrophy type 2A, associates with connectin through IS2, a p94-specific sequence; *J Biol Chem*, 270: 31158-31162

Spadoni, C., Farkas, A., Sinka, R., Tompa, P. és Friedrich, P. (2003) Molecular cloning and RNA expression of a novel *Drosophila* calpain, Calpain C; *Biochem Biophys Res Commun*, 303: 343-349

Spencer, M. J., Guyon, J. R., Sorimachi, H., Potts, A., Richard, I., Herasse, M., Chamberlain, J., Dalkilic, I., Kunkel, L. M. és Beckmann, J. S. (2002) Stable expression of calpain 3 from a

muscle transgene *in vivo*: immature muscle in transgenic mice suggests a role for calpain 3 in muscle maturation; Proc Natl Acad Sci U S A, 99: 8874-8879

Sreenan, S. K., Zhou, Y. P., Otani, K., Hansen, P. A., Currie, K. P., Pan, C. Y., Lee, J. P., Ostrega, D. M., Pugh, W., Horikawa, Y., Cox, N. J., Hanis, C. L., Burant, C. F., Fox, A. P., Bell, G. I. és Polonsky, K. S. (2001) Calpains play a role in insulin secretion and action; Diabetes, 50: 2013-2020

Stabach, P. R., Cianci, C. D., Glantz, S. B., Zhang, Z. és Morrow, J. S. (1997) Site-directed mutagenesis of alpha II spectrin at codon 1175 modulates its mu-calpain susceptibility; Biochemistry, 36: 57-65

Stevanovic, S. és Bohley, P. (2001) Proteome analysis by three-dimensional protein separation: turnover of cytosolic proteins in hepatocytes; Biol Chem, 382: 677-682

Strange, R. C., Spiteri, M. A., Ramachandran, S. és Fryer, A. A. (2001) Glutathione-S-transferase family of enzymes; Mutat Res, 482: 21-26

Strobl, S., Fernandez-Catalan, C., Braun, M., Huber, R., Masumoto, H., Nakagawa, K., Irie, A., Sorimachi, H., Bourenkow, G., Bartunik, H., Suzuki, K. és Bode, W. (2000) The crystal structure of calcium-free human m-calpain suggests an electrostatic switch mechanism for activation by calcium; Proc Natl Acad Sci U S A, 97: 588-592

Suzuki, K., Hata, S., Kawabata, Y. és Sorimachi, H. (2004) Structure, activation, and biology of calpain; Diabetes, 53 Suppl 1: S12-18

Suzuki, K., Tsuji, S., Kubota, S., Kimura, Y. és Imahori, K. (1981) Limited autolysis of Ca²⁺-activated neutral protease (CANP) changes its sensitivity to Ca²⁺ ions; J Biochem (Tokyo), 90: 275-278

Theopold, U., Pinter, M., Daffre, S., Tryselius, Y., Friedrich, P., Nassel, D. R. és Hultmark, D. (1995) CalpA, a Drosophila calpain homolog specifically expressed in a small set of nerve, midgut, and blood cells; Mol Cell Biol, 15: 824-834

Todd, B., Moore, D., Deivanayagam, C. C., Lin, G. D., Chattopadhyay, D., Maki, M., Wang, K. K. és Narayana, S. V. (2003) A structural model for the inhibition of calpain by calpastatin: crystal structures of the native domain VI of calpain and its complexes with calpastatin peptide and a small molecule inhibitor; *J Mol Biol*, 328: 131-146

Tompa, P., Baki, A., Schad, E. és Friedrich, P. (1996) The calpain cascade. Mu-calpain activates m-calpain; *J Biol Chem*, 271: 33161-33164

Tompa, P., Buzder-Lantos, P., Tantos, A., Farkas, A., Szilagyi, A., Banoczi, Z., Hudecz, F. és Friedrich, P. (2004) On the sequential determinants of calpain cleavage; *J Biol Chem*, 279: 20775-20785

Tompa, P., Emori, Y., Sorimachi, H., Suzuki, K. és Friedrich, P. (2001) Domain III of calpain is a Ca^{2+} -regulated phospholipid-binding domain; *Biochem Biophys Res Commun*, 280: 1333-1339

Towbin, H., Staehelin, T. és Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications; *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76: 4350-4354

Unlu, M., Morgan, M. E. és Minden, J. S. (1997) Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts; *Electrophoresis*, 18: 2071-2077

Wang, J. és Maldonado, M. A. (2006) The ubiquitin-proteasome system and its role in inflammatory and autoimmune diseases; *Cell Mol Immunol*, 3: 255-261

Wang, K. K., Nath, R., Posner, A., Raser, K. J., Buroker-Kilgore, M., Hajimohammadreza, I., Probert, A. W., Jr., Marcoux, F. W., Ye, Q., Takano, E., Hatanaka, M., Maki, M., Caner, H., Collins, J. L., Fergus, A., Lee, K. S., Lunney, E. A., Hays, S. J. és Yuen, P. (1996) An alpha-mercaptoacrylic acid derivative is a selective nonpeptide cell-permeable calpain inhibitor and is neuroprotective; *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93: 6687-6692

Watt, F. és Molloy, P. L. (1993) Specific cleavage of transcription factors by the thiol protease, m-calpain; *Nucleic Acids Res*, 21: 5092-5100

Wendt, A., Thompson, V. F. és Goll, D. E. (2004) Interaction of calpastatin with calpain: a review; *Biol Chem*, 385: 465-472

Yamaguchi, M. (2000) Role of regucalcin in calcium signaling; *Life Sci*, 66: 1769-1780

Yamaguchi, M. és Nishina, N. (1995) Characterization of regucalcin effect on proteolytic activity in rat liver cytosol: relation to cysteinyl-proteases; *Mol Cell Biochem*, 148: 67-72

Yamakawa, H., Banno, Y., Nakashima, S., Yoshimura, S., Sawada, M., Nishimura, Y., Nozawa, Y. és Sakai, N. (2001) Crucial role of calpain in hypoxic PC12 cell death: calpain, but not caspases, mediates degradation of cytoskeletal proteins and protein kinase C-alpha and -delta; *Neurol Res*, 23: 522-530

Yan, J. X., Harry, R. A., Spibey, C. és Dunn, M. J. (2000) Postelectrophoretic staining of proteins separated by two-dimensional gel electrophoresis using SYPRO dyes; *Electrophoresis*, 21: 3657-3665

Yoshikawa, Y., Mukai, H., Hino, F., Asada, K. és Kato, I. (2000) Isolation of two novel genes, down-regulated in gastric cancer; *Jpn J Cancer Res*, 91: 459-463

Yoshizawa, T., Sorimachi, H., Tomioka, S., Ishiura, S. és Suzuki, K. (1995) Calpain dissociates into subunits in the presence of calcium ions; *Biochem Biophys Res Commun*, 208: 376-383

Zhang, W., Lu, Q., Xie, Z. J. és Mellgren, R. L. (1997) Inhibition of the growth of WI-38 fibroblasts by benzyloxycarbonyl-Leu-Leu-Tyr diazomethyl ketone: evidence that cleavage of p53 by a calpain-like protease is necessary for G1 to S-phase transition; *Oncogene*, 14: 255-263

Zimmerman, U. J., Boring, L., Pak, J. H., Mukerjee, N. és Wang, K. K. (2000) The calpain small subunit gene is essential: its inactivation results in embryonic lethality; *IUBMB Life*, 50: 63-68

Zuo, X., Echan, L., Hembach, P., Tang, H. Y., Speicher, K. D., Santoli, D. és Speicher, D. W. (2001) Towards global analysis of mammalian proteomes using sample prefractionation prior to narrow pH range two-dimensional gels and using one-dimensional gels for insoluble and large proteins; *Electrophoresis*, 22: 1603-1615

Összefoglaló

A kalpain családot intracelluláris elhelyezkedésű, kalcium-ionok által aktivált neutrális cisztein-proteázok alkotják, melyek szubsztrátjaikat csak limitáltan hasítják. Ubikviter és szövetspecifikus előfordulásuk is lehetnek ezek az egy vagy két alegységes fehérjék, melyek számos, sejtszintű szabályozó folyamatban vesznek részt. Ezért nem meglepő, hogy rendellenes működésük igen súlyos patológiás elváltozásokhoz vezet. Az Alzheimer- és a Parkinson-kór, az izomdisztrófia, a 2-es típusú cukorbetegség, mind olyan betegségek, ahol már megfigyelték a kalpain rendszer hibás működését.

Az inaktív proenzimként keletkező kalpait a kalcium-ionok aktiválják. Az első kalpain röntgenszerkezetek megismerése után számos kalcium-kötőhelyet azonosítottak a molekulában, azonban mind a mai napig nem ismert olyan szerkezet, amiben a kalpait kalcium-ionok jelenlétében, aktív konformációban kristályosították volna. Így nem tudni, milyen molekuláris átrendeződések zajlanak az aktiválódás során. Még összetettebb ez a probléma, annak ismeretében, hogy a fő, kalciumköti domének az enzimmolekula ellentétes oldalán helyezkednek el a katalitikus centrumhoz képest.

Célul tűztük ki, hogy irányított mutagenézis segítségével kialakított változtatások hatását vizsgálva feltérképezzük az aktiválódás folyamatát. Húsz különböző mutációt hoztunk létre, egy savas aminosavakban gazdag hurok régióban és egy nyújtott konformációjú szegmensben. A mutáns enzimekkel folytatott kísérletek eredményeinek segítségével egy modellt állítottunk fel, melynek lényege, hogy a hurok régió és a nyújtott lánc egy funkcionális egységet alkot az aktiválódás során. Azonosítottunk egy olyan mutánst is, mely a vad típusú enzimhez képest, már négy nagyságrenddel alacsonyabb kalcium koncentrációnál is eléri aktivitásának 40%-át.

A kalpain fiziológiai folyamatokban betöltött szerepének megismeréséhez elengedhetetlen a kalpain szubsztrátok pontos ismerete. Több mint száz fehérjéről kimutatták már, hogy a kalpain *in vitro* képes a hasításukra, ám csak kevés esetben igazolták eddig, hogy a bontás *in vivo* is lezajlik. Ezért célul tűztük ki egy *in vivo* kalpain szubsztrát azonosításra alkalmas technika kifejlesztését. Kétféleképpen kezelt illetve kezeletlen sejtek fehérjemintázatát hasonlítottuk össze 2D-s gélelektroforetikus fehérje szétválasztás után. Kísérleteinkben 11 lehetséges kalpain szubsztrátot azonosítottunk, melyek közül négyet rekombináns módszerekkel történő előállítás után *in vitro* körülmények között is leteszteltünk, és mind a négy fehérjéről igazoltuk, hogy valódi szubsztrátja a kalpainnak.

Summary

The family of calpains consists of intracellular, calcium-activated, neutral, cysteine proteases that cleave their substrates only limited manner. These enzymes are composed of one or two subunits and are ubiquitous and tissue-specific. Plenty of cellular processes are regulated by calpains, so abnormal action of these enzymes causes such pathological diseases as Alzheimer- and Parkinson-diseases, muscular dystrophy or diabetes type 2.

Calpain is synthetised as an inactive proenzyme and is activated by calcium-ions. After the first X-ray structures of calpain, several calcium binding sites of the molecule were identified, though untill now there isn't any structure where a calpain was crystallized in the presence of calcium-ions. It is not known what kind of molecular rearrangement happens during the activation. This problem is more complex, if we know that the main calcium binding domains are located at the opposite side of the enzyme than the catalytic centre.

We aimed to explore the activation process by the affects of site-directed mutagenesis. Twenty different mutations were developed on an acidic loop region and on an extended segment. With the interpretation of the experimental results of the mutant enzymes we set up a model. The substance of the model is that the loop region and the extended chain together compose a functional unit during the activation. We identified a mutant that reaches forty percent of its activity at four-time lower calcium concentration than the wild-type enzyme.

For the recognition of the calpain's role in physiological processes is crucial to know the calpain substrates. About more than hundred proteins were reported that calpain can cleave under *in vitro* conditions, though only a few of them were verified as *in vivo* substrates. We put ourselves an aim to develop a technique to identify *in vivo* calpain substrates. The protein patterns of two kinds of treated and of untreated cells were compared after separation of the proteins by 2D electrophoresis. We identified eleven substrate candidates, from which four proteins were selected for *in vitro* testing. We found that each of the four proteins is a physiological calpain substrate.

Függelék

Kalpain #	Kalpain gén	Egyéb név	EF-hand	Szövet típus	Fajok	Kromoszóma #	Genebank #
Kalpain 1	capn1	CAPN1	+	ubikviter	humán	11q13	X04366
					egér	19	NM_007600
					patkány	nem ismert	NM_019152
Kalpain 2	capn2	m-Kalpain, CAPN2	+	ubikviter	humán	1q41	NM_001748
					egér	nem ismert	NM_009794
					patkány	nem ismert	NM_017116
Kalpain 3	capn3	nCL-1, p94, (Lp82, Lp85 Rt88)	+	vázizomzat, szemlencse, retina	humán	15q15.1	X85030
					egér	2	NM_007601 AF091998
					patkány	nem ismert	NM_017117 U9636
Kalpain 5	capn5	htra3, nCL-3	-	ubikviter (vastagbélben, vékonybélben, és herében magas)	humán	11q14	NM_004055
					egér	7	NM_007602
					patkány	nem ismert	nem ismert
Kalpain 6	capn6	CAPNX, Calpamodulin	-	placenta	humán	Xq28	NM_014289
					egér	X	NM_007603
					patkány	nem ismert	AF067793
Kalpain 7	capn7	palBH	-	ubikviter	humán	3p24-p25	AB028639
					egér	nem ismert	NM_009796
					patkány	nem ismert	nem ismert
Kalpain 8	capn8	nCL-2	+	gyomor nyálkahártya	humán	1q41	AA_043093
					egér	nem ismert	nem ismert
					patkány	nem ismert	D14479- D14480
Kalpain 9	capn9	nCL-4	+	emésztő traktus	humán	1q42	NM_006615
					egér	nem ismert	U89513
					patkány	nem ismert	U89514
Kalpain 10	capn10	CAPN10, CAPN8	-	ubikviter	humán	2q37.3	AF089088, AF089090 -96
					egér	nem ismert	NM_011796, AF089089
					patkány	nem ismert	AF227909
Kalpain 11	capn11	CAPN11	+	here	humán	6p12	AJ242832
					egér	nem ismert	nem ismert
					patkány	nem ismert	nem ismert
Kalpain 12	capn12	CAPN12	+	ubikviter (hajtűszőben magas a szintje)	humán	nem ismert	nem ismert
					egér	19q13	AJ289241
					patkány	nem ismert	nem ismert
Kalpain 13	capn13	CAPN13	+	here/tüdő	humán	2p22.2-p22.3	AC068689
Kalpain 14	capn14	CAPN14	-	ubikviter	humán	2p22.2-p22.3	AC015980
Kalpain 15	capn15	Sol H	-	ubikviter	humán	16p13.3	U85647
					egér	17A3.3	NM015830
					patkány	nem ismert	nem ismert

Kalpain kis alegység 1	capn-s1 vagy cps1	CAPN4	+	ubikviter	humán	19q13.1	NM_001749
					egér	nem ismert	NM_009795
					patkány	nem ismert	RNU10861
Kalpain kis alegység 2	capn-s2 vagy cps2		+	nem ismert	humán	16	AC026802
					egér	nem ismert	AK009171
					patkány	nem ismert	nem ismert

1. táblázat: Az emlős kalpain formák